



PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO REGULADA POR FACTORES ENDOCRINOS. PAPEL DE LA PROLACTINA

TESIS DOCTORAL

Doctorado en Neurociencias
Departamento de Anatomía, Histología y Neurociencias
Facultad de Medicina

Alfonsa Zamora Moratalla

Director
Eduardo Daniel Martín Montiel

JUNIO 2017



MINISTERIO
DE ECONOMIA
Y COMPETITIVIDAD



D. Eduardo D. Martín Montiel, Científico Titular del Consejo Superior de Investigaciones Científicas en el Instituto Cajal, Avda. Doctor Arce 37, Madrid.

HACE CONSTAR:

Que Dña. Alfonsa Zamora Moratalla ha realizado bajo mi dirección los trabajos correspondientes a la Tesis Doctoral titulada “PLASTICIDAD SINÁPTICA EN EL HIPOCAMPO REGULADA POR FACTORES ENDOCRINOS. PAPEL DE LA PROLACTINA”.

Considero que dichos trabajos han sido ejecutados satisfactoriamente, y una vez revisados manifiesto mi conformidad con la presentación de esta tesis para ser juzgada.

Para que conste y surta los efectos oportunos, lo firmo en Madrid, a 26 días del mes de junio de 2017.

Fdo.: Eduardo D. Martín Montiel

Avda Doctor Arce 37
28002 Madrid, SPAIN
Telf. +34 91 5854750
Fax.: +34 91 5854754

“Without of theory the facts are silent”
Friederich A. von Hayek

Financiación

Regulación de la plasticidad sináptica en el hipocampo por el sistema endocrino. Papel de la prolactina. Ref: BFU2014-57929-P. Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación, Ministerio de Economía y Competitividad, España.

IP: Eduardo Daniel Martín Montiel

Plasticidad sináptica independiente de receptores NMDA en el hipocampo. Ref: BFU2011-26339. Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación, Ministerio de Economía y Competitividad, España.

IP: Eduardo Daniel Martín Montiel

Beca Subprograma de Formación Personal Investigador (FPI). Ref: BES-2012-052076, Proyecto: Plasticidad sináptica independiente de receptores NMDA en el hipocampo. Secretaría de Estado de Investigación, Desarrollo e Innovación, Ministerio de Economía y Competitividad, España.

BENEFICIARIO: Alfonsa Zamora Moratalla

IP: Eduardo Daniel Martín Montiel.

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo bajo la aprobación de la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Consejería de Agricultura de Castilla-La Mancha (**Ref. 1036620**).

Resumen

Las células del tejido nervioso modifican su organización estructural y funcional gracias a una propiedad que se denomina plasticidad neuronal. Datos previos indican que el Sistema Endocrino (SE) ejerce una importante influencia sobre la plasticidad del Sistema Nervioso y, en particular, el éxito de la supervivencia de los mamíferos depende de las adaptaciones que ocurren en el cerebro de la madre a lo largo de la gestación, parto, lactancia y cuidados postnatales. Si bien la Prolactina (PRL) desempeña un importante papel en estas etapas, su capacidad para inducir cambios plásticos en el SN son prácticamente desconocidos. Por lo tanto, el objetivo del presente trabajo de tesis consiste en estudiar los mecanismos celulares, circuitales y los posibles receptores sinápticos involucrados en los cambios plásticos sinápticos inducidos por la PRL en el hipocampo. Empleando técnicas electrofisiológicas extracelulares y de patch-clamp en rodajas de cerebro de ratones así como estudios extracelulares de campo en animales anestesiados, pudimos establecer que la PRL es capaz de modificar la plasticidad sináptica a corto y largo plazo en el hipocampo. Estos cambios se llevan a cabo a través de mecanismos que incluyen la participación de receptores GABAérgicos, dopaminérgicos, cambios en la probabilidad de liberación de neurotransmisor y la vía de señalización mediada por JAK2. Por otra parte, existe una acción sinérgica entre la PRL y el β -estradiol y la interacción entre estas hormonas es capaz de modular la plasticidad sináptica de la región CA1 en el hipocampo en situaciones en las que la función ovárica está anulada. El presente trabajo constituye a la primera evidencia experimental que se tiene sobre la acción de esta hormona sobre la plasticidad sináptica y a una mejor comprensión de los mecanismos a través de los cuales el SN procesa, almacena y recupera la información.

Abstract

The cells of nervous tissue can modify their structural and functional organization through a property called neuronal plasticity. This enables the nervous system (NS) to perform continuous morphological and synaptic adjustments to create new connections and generate new circuits. Moreover, the endocrine system (ES) and NS are both essential to the communication throughout the body and the maintenance of homeostasis. In most cases, they work in different ways and have different means of transmitting their signals from one place to another but the two systems also overlap and work together in important respects. It is well established that ES modulates brain plasticity but it is not clear yet whether hormones, such as prolactin, may regulate functional synaptic plasticity. Therefore, the main aim of the present work was to determine the cellular and molecular mechanisms mediated by prolactin which regulate different forms of synaptic plasticity such as long-term potentiation (LTP) in the hippocampus. Using extracellular and patch-clamp electrophysiological techniques in brain slices of mice as well as extracellular *in vivo* recordings of urethane anesthetized mice, we have determined that PRL can modify the short and long term synaptic plasticity in hippocampus. These changes are carried out through mechanisms that include GABAergic and dopaminergic receptors regulation, changes in the probability of neurotransmitter release and activation the JAK2-mediated signalling pathway. In addition, we demonstrate that a synergistic action between PRL and β -estradiol can improve the synaptic strength of the CA1 region in the hippocampus under suppression of ovarian function. These findings will enhance our understanding of the mechanisms by which the NS processes, stores and recalls information, thereby facilitating complex processes such as learning in general and particular physiological situation. Furthermore, this knowledge will provide new insight into NS pathologies that involve a deficit in

the different forms of learning and memory as well as synaptic and circuit changes that occur in different diseases of NS.

Abreviaturas

A₁: receptor de adenosina tipo 1.

aCSF: líquido cefalorraquídeo artificial (del inglés, *artificial Cerebrospinal Fluid*).

ACTH: hormona adenocorticotrofa (del inglés *adrenocorticotropic hormone*).

AD: enfermedad de Alzheimer (del inglés *Alzheimer's disease*).

AG 490: del inglés, *(E)-2-Cyano-3-(3,4-dihydrophenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide*.

AMPA: *α-Amino-3-hydroxy-5-Methylisoxazole-4-Propionic Acid*.

ARNm: ácido ribonucleico mensajero.

β-E: β-Estradiol.

BIC: Bicuculina.

CNQX: del inglés, *6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium*.

CB: Cabergolina.

C_m: Capacidad de la membrana.

CRH o **CRF**: hormona liberadora de la corticotrofina (del inglés *corticotropin releasing hormone* o *corticotropin releasing factor*, respectivamente).

D₁: receptor de dopamina tipo 1.

D₂: receptor de dopamina tipo 2.

D: Diestro.

DA: Dopamina.

D-AP5: del inglés, *D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid*.

DG: giro dentado (del inglés *Dentate Gyrus*).

DMSO: Dimetil Sulfóxido (del inglés *Dimethyl Sulfoxide*).

E: Estro.

ER_α: receptor de estrógenos α.

ER_β: receptor de estrógenos β.

ES: Endocrine System.

Φ : Frecuencia.

fEPSP: potenciales de campo excitadores post-sinápticos (del inglés, *field Excitatory PostSynaptic Potential*).

FSH: hormona folículo estimulante (del inglés, *Follicle-Stimulating Hormone*).

g_{animal}: peso corporal, en gramos, del animal.

g_{útero}: peso en gramos del útero.

GABA: del inglés, *Gamma-Aminobutyric Acid*.

GH: hormona del crecimiento (del inglés *growth hormone*).

GHRH: hormona liberadora de la hormona del crecimiento (del inglés *growth hormone releasing hormone*).

GnRH o LHRH: hormona liberadora de las gonadotrofinas (del inglés *gonadotropin releasing hormone* o *luteinizing hormone releasing hormone*, respectivamente).

HCL: gonadotrofina coriónica humana (del inglés *human chorionic gonadotrophin*).

HFS: estimulación de alta frecuencia (del inglés, *High-Frequency Stimulation*).

i.p.: intraperitoneal.

IPSC: corriente inhibidora postsináptica (del inglés, *Inhibitory Postsynaptic Current*).

JAK: tirosina quinasa de Janus (del inglés, *Janus Kinase*).

L18-L21: hembras reproductoras en periodo de lactancia.

LH: hormona luteinizante (del inglés, *Luteinizing Hormone*).

LTD: depresión sináptica a largo plazo (del inglés, *Long-Term-Depression*).

LTP: potenciación sináptica a largo plazo (del inglés, *Long-Term Potentiation*).

M: Metaestro.

MAPK: quinasas activadas por mitógenos (del inglés, *Mitogenic-Activated Protein Kinases*).

MF: fibras musgosas (del inglés *Mossy Fiber*).

NMDA: del inglés, *N-methyl-D-aspartate*.

NS: Nervous System.

OVX: hembras ovariectomizadas de 7 a 8 semanas de edad.

P: Proestro.

P15-P20: crías hembra de entre 15 y 20 días de edad.

P20-P27: crías hembra de entre 20 y 27 días de edad.

PA: Potencial de Acción.

PI3K: fosfatidil-Inositol 3' quinasa (del inglés, *Phosphatidyl-Inositol-3-Kinase*).

PKA: proteína quinasa A (del inglés, *Protein Kinase A*).

PKC: proteína quinasa C (del inglés, *Protein Kinase C*).

PL: lactógeno placentario (del inglés *Placental Lactogen*).

PP: vía perforante (del inglés *Path Perforant*).

PIF: factor inhibidor de prolactina (del inglés *Prolactin-Inhibiting Factor*).

PPF: facilitación por pares de pulsos (del inglés, *Paired-Pulse Facilitation*).

PRF: factor liberador de prolactina (del inglés *Prolactin-Releasing Factor*).

PRL: Prolactina.

PSC: corriente postsináptica (del inglés, *PostSynaptic Current*).

PTP: potenciación posttetánica (del inglés, *Post-Tetanic Potentiation*).

PTX: Picrotoxina.

P₄: Progesterona.

R₁: primera respuesta sináptica.

R₂: segunda respuesta sináptica.

R_s: Resistencia en serie.

RT: Temperatura ambiente (del inglés, *Room Temparture*).

s.c.: subcutáneo.

SCH: SCH 23390, del inglés, *(R)- (+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2, 3, 4, 5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride*.

SCs: fibras colaterales de Schaffer (del inglés, *Schaffer Collaterals*).

SE: Sistema Endocrino.

SN: Sistema Nervioso.

SNC: Sistema Nervioso Central.

SPD: Sulpiride.

SR: Stratum Radiatum.

STAT: del inglés, *Signal Transducer and Activator of Transcription*.

TBS: estimulación de baja frecuencia (del inglés, *Theta-Burst Stimulation*).

TEA: tetraetilamonio (del inglés, *Tetraethylammonium*).

TIDA: neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (del inglés, *Tuberoinfundibular Dopamine*).

TRH o **TRF:** hormona liberadora de tirotrofina (del inglés *thyrotropin releasing hormone* o *thyrotropin releasing factor*, respectivamente).

TSH: hormona estimuladora del tiroides (del inglés *thyroid-stimulating hormone*).

V_H: potencial de fijación de voltaje.

V_m: potencial de membrana.

Índice de Contenidos

Financiación.....	ix
Resumen.....	xi
Abstract.....	xiii
Abreviaturas.....	xv
Índice de Contenidos.....	xix

INTRODUCCIÓN 1

1.1.- Plasticidad Sináptica.....	3
1.2.- Sistema Endocrino. Hormonas.....	9
1.3.- Prolactina. Mecanismos de regulación.....	17
1.4.- Efectos de la Prolactina sobre el Sistema Nervioso.....	24

Hipótesis.....	29
Objetivos.....	31

MATERIALES Y MÉTODOS 33

2.1.- Animales.....	35
2.2.- Electrofisiología.....	36
2.3.- Técnicas quirúrgicas.....	45
2.4.- Grupos Experimentales.....	47
2.5.- Fármacos.....	49
2.6.- Análisis de los datos.....	51

RESULTADOS 53

DISCUSIÓN 83

Conclusiones.....	99
Bibliografía.....	101

INTRODUCCIÓN

1.1.- Plasticidad Sináptica

1.2.- Sistema Endocrino. Hormonas

1.3.- Prolactina. Mecanismos de regulación

1.4.- Efectos de la Prolactina sobre el Sistema
Nervioso

Plasticidad Sináptica

La plasticidad sináptica puede definirse como un cambio en la eficacia de sinapsis individuales, dependiente de su actividad local. Esto le permite al Sistema Nervioso (SN) realizar un continuo reajuste morfológico y sináptico con el objeto de crear nuevas conexiones y dar origen a nuevos circuitos. El concepto de la plasticidad del SN fue inicialmente introducido por Santiago Ramón y Cajal quien postulaba que la actividad mental origina un enriquecimiento de la conectividad neuronal y, además, promueve el crecimiento de los procesos neuronales, dendritas y axones (Ramón y Cajal, 1894). Dentro de las distintas formas de plasticidad sináptica descritas la más estudiada es la plasticidad asociativa o Hebbiana, dado que se la considera un correlato celular del aprendizaje asociativo. En 1973, Bliss y Lømo demostraron que la estimulación tetánica de las fibras pre-sinápticas de la vía perforante provocaba incrementos estables y duraderos de la respuesta sináptica en las células granulares (Bliss and Lømo, 1973). A este fenómeno lo llamaron “potenciación sináptica a largo plazo” (LTP, del inglés *Long-Term Potentiation*). La importancia del estudio de la LTP radica en el hecho de ser la primera evidencia electrofisiológica de que la modificación de los patrones de activación pre y post-sinápticos conducen a cambios a largo plazo en la eficiencia sináptica, considerándose como un correlato celular y molecular de la memoria y el aprendizaje (Lynch, 2004). El hipocampo ha sido la estructura cerebral donde más estudios de LTP se han realizado, pero existen otras zonas del cerebro como la corteza cerebral, la amígdala y el cerebelo donde se da este fenómeno. Los mecanismos mejor caracterizados de la LTP son los dependientes de receptores de glutamato tipo N-metil-D-aspartico (NMDA). Este receptor se comporta como un detector de coincidencia entre la actividad pre y post-sináptica, tiene que coincidir un aumento en la liberación de glutamato a nivel pre-sináptico con una despolarización post-sináptica que permita la entrada de Ca^{2+} (Malenka, 1991;

Malenka y Nicoll, 1993). Esta despolarización puede ser debida a la activación persistente de receptores AMPA que despolarizan la membrana o, por ejemplo, a potenciales de acción (PA) propagados en forma retrógrada capaces de despolarizar la post-sinapsis (Soderling y Derkach, 2000). La LTP implica modificaciones funcionales y estructurales, como, por ejemplo, los cambios en la morfología de las espinas dendríticas (aumento del volumen de las espinas, del número de espinas y/o del número de botones sinápticos) y, también, cambios en la estructura del citoesqueleto a nivel postsináptico (Soderling y Derkach, 2000).

Los modelos de LTP independientes de receptores NMDA están menos estudiados por lo que disponemos de menor información sobre sus mecanismos de acción intracelular, aunque es posible que compartan rutas de señalización con la potenciación a largo plazo dependiente de receptores NMDA. En la región de CA1 del hipocampo, se puede inducir una LTP independiente de receptores NMDA con distintas aproximaciones experimentales. Por ejemplo, la aplicación de tetraetilamonio (TEA) provoca un aumento transitorio de la liberación de glutamato que genera una despolarización que activa canales de Ca^{2+} voltaje-dependientes (Aniksztejn y Ben-Ari, 1991; Huang y Malenka, 1993). También puede obtenerse este tipo de LTP estimulando a frecuencias muy altas (200 Hz) (Kanterewicz et al., 2000) o perfundiendo acetilcolina (Fernández de Sevilla et al., 2008). Otra forma de obtener LTP independiente de NMDA en la sinapsis de CA3-CA1 es aplicar cafeína (Martín y Buño, 2003; Lao Peregrín et al., 2016). En este tipo de potenciación sináptica existe un incremento en la probabilidad de liberación de glutamato gracias a la acción sinérgica del bloqueo de receptores de adenosina tipo A_1 y al aumento del Ca^{2+} intracelular pre-sináptico proveniente de los depósitos regulados por rianodina (Martín y Buño, 2003; 2005; Lao Peregrín et al., 2016). En las sinapsis de las fibras musgosas del hipocampo se han estudiado fenómenos de LTP independiente de receptores NMDA a nivel pre-sináptico

(Monaghan y Cotman, 1982; Harris y Cotman, 1986; Zalutsky y Nicoll, 1990). Por otra parte, recientes estudios *in vitro* e *in vivo*, demuestran que ciertas formas de plasticidad sináptica independiente de receptores NMDA, inducida a través de la activación de vías colinérgicas, están mediadas por los astrocitos (Navarrete et al., 2012), a través de una interacción entre los procesos astrocitarios y las espinas dendríticas que implica un cambio estructural y funcional (Perez-Álvarez et al., 2014).

En 1997, Markram y colaboradores, utilizando doble registro en célula entera, descubrieron que las características y la magnitud de la LTP y la LTD (del inglés *Long-Term Depression*) dependían del orden y la coincidencia de espigas pre y post-sinápticas en un intervalo de 10 ms (Markram et al., 1997), sugiriendo que los PA que se propagan de forma retrógrada a través de las dendritas modifican las conexiones sinápticas activas individuales, dependiendo del patrón de actividad eléctrica en las neuronas pre y post-sinápticas (Markram et al., 1997). Esta dependencia fue estudiada en detalle por Bi y Poo (1998) y la llamaron “plasticidad dependiente de la coincidencia de espiga” (STDP, del inglés *Spike-Timing-Dependent Plasticity*; Song et al., 2000). La STDP gobierna múltiples formas de plasticidad (Bell et al., 1997; Celikel et al., 2004).

HIPOCAMPO. El hipocampo es una estructura del SNC que pertenece al sistema límbico y está realacionada con la memoria espacial y la percepción; es, sin duda la estructura del SN donde más se han estudiado los fenómenos de plasticidad sináptica. Está localizado en el interior del lóbulo temporal y se considera parte de la corteza cerebral primitiva.

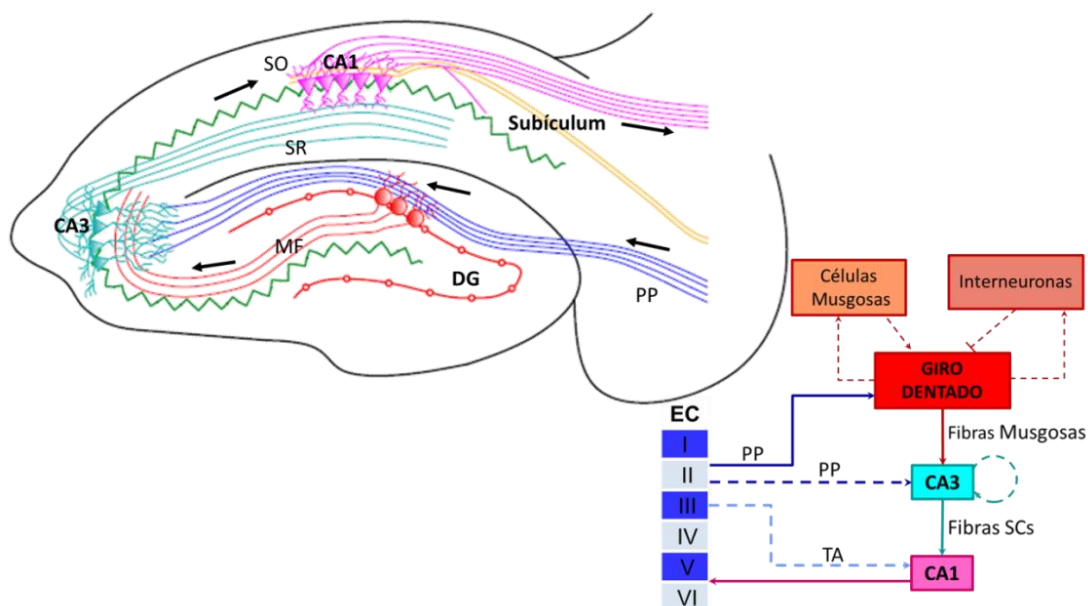


Figura 1. Estructura del hipocampo. Corte transversal del hipocampo que muestra, siguiendo la dirección de las flechas de derecha a izquierda, la principal entrada procedente de las capas superficiales II y III de la corteza entorrinal (EC, del inglés *Entorhinal Cortex*) a través de la vía perforante (PP, del inglés *Path Perforant*). Los axones de la PP hacen sinapsis con las neuronas granulares del giro dentado (DG, del inglés *Dentate Gyrus*) y las neuronas piramidales de CA3. Los axones de las neuronas granulares, fibras musgosas (MF, del inglés *Mossy Fiber*), se prolongan hasta las dentritas apicales de CA3 cuyos axones conocidos como fibras colaterales de Schaffer (SCs, del inglés *Schaffer Collateral*) discurren por el *stratum radiatum* (SR) donde hacen contacto sináptico con CA1, completando la vía trisináptica clásica. La mayor vía de salida del hipocampo la forman los axones de CA1 que proyectan a las capas profundas V y VI de la EC. Inserto en la figura se observa un diagrama de bloques que representa estas mismas conexiones de forma esquemática.

En la figura 1 se muestra un corte transversal del hipocampo donde podemos diferenciar las partes que lo constituyen, el asta o cuerno de Amón, el giro dentado y el subículo, así como sus principales conexiones (Amaral y Witter, 1989). El cuerno de Amón que se corresponde con la línea verde en zig-zag de la imagen del hipocampo (Figura 1), está formado por una capa central de neuronas piramidales que se disponen en forma concéntrica y enrollada sobre sí misma. El nombre de estas células se debe a un soma definido en forma de pirámide del que

emergen tres principales dendritas, una apical y dos basales. Son mayoritariamente neuronas glutamatérgicas con una función excitadora (Soriano y Frotscher, 1994). Se distinguen tres regiones que se conocen como CA3 (triángulos color cyan, figura 1), CA2 y CA1 (triángulos rosas, figura 1) (*cornu Ammonis* 3, 2 y 1) que presentan diferencias tanto en la morfología como en la función de las células que lo componen (Ramon y Cajal, 1911; Lorente de Nó, 1934; Amaral y Witter, 1989). El giro dentado (DG, del inglés *Dentate Gyrus*) representado con una circunvolución roja en el dibujo de la figura 1, está constituido por una capa molecular, formada por el soma de interneuronas axoaxónicas, una capa granular que contiene el soma de las células granulares, cuyo árbol dendrítico se distribuye por la capa molecular, y una capa polimórfica que contiene células musgosas y de tipo fusiforme (Claiborne et al., 1986; Seress, 1988; Scharfman, 1995). La mayoría de estas células son GABAérgicas (Han et al., 1993). El DG recibe entradas directas de la corteza entorrinal, estas fibras forman la vía perforante (líneas paralelas en azul oscuro, figura 1) y hacen sinapsis en el *stratum lacunosum-moleculare* con las neuronas de la capa molecular del giro dentado (Soriano y Frotscher, 1989; Soriano et al., 1990; Han et al., 1993; Buhl et al., 1994). Sus principales eferencias son los axones de las células granulares, denominadas fibras musgosas (líneas paralelas en rojo, figura 1), que discurren por el *stratum lucidum* y finalizan en CA3 (Li et al., 1994). Los axones de estas neuronas o fibras colaterales de Schaffer se distribuyen por el *stratum radiatum* (SR) donde hacen sinapsis con las dendritas apicales de las células piramidales CA1. Por otra parte, las dendritas basales de estas neuronas se prolongan por el *stratum oriens* (SO). Por último, el subículo es el área de transición entre el hipocampo y la corteza entorrinal donde se originan, principalmente, las proyecciones eferentes del hipocampo. Los axones de las células del subículo y la capa piramidal atraviesan el *stratum alveus*, justo debajo del ventrículo lateral, dando lugar a la vía de salida

hacia la EC (Van Groen y Wyss, 1990; Yeckel y Berger, 1990). En los diferentes *stratums*, *radiatum*, *lacunosum-moleculare* y *oriens* se distribuyen neuronas de morfología no piramidal consideradas como interneuronas dentro de los circuitos del hipocampo (Kunkel et al., 1988).

Sistema endocrino. Hormonas

El sistema endocrino (SE) es el responsable de mantener la homeostasis del medio interno y desempeña un papel fundamental en la regulación del crecimiento, el desarrollo, el metabolismo y la reproducción, interactuando, además, con el SNC modificando su estructura y función. El SE consta de diversas glándulas de secreción interna reguladas por distintas regiones del cerebro como el hipotálamo y la hipófisis. La fisiología endocrina implica la secreción de hormonas y su posterior acción en los órganos diana.

El hipotálamo se localiza en la región del tercer ventrículo y está formado por numerosos núcleos implicados en la regulación de diferentes funciones y la homeostasis del organismo. La hipófisis consta de dos lóbulos conocidos como hipófisis anterior (adenohipófisis) e hipófisis posterior (neurohipófisis). La hipófisis posterior está conectada directamente con el hipotálamo y almacena y segrega la vasopresina (ADH) y la oxitocina (Urano y Ando, 2011). La hipófisis anterior se comunica con el hipotálamo por medio de vasos sanguíneos a través del sistema porta hipotálamo hipofisario (Harris y Pickles, 1953). La mayoría de hormonas segregadas por ésta se denominan *hormonas tróficas (tropinas)* porque estimulan la secreción hormonal de otras glándulas que son su diana.

Las hormonas liberadas por el hipotálamo son conocidas como “factores de liberación” y “hormonas hipofisiotrofas”, pueden ser inhibidoras o excitadoras y regulan la liberación de las hormonas de la hipófisis anterior. Entre todas ellas podemos destacar la somatostatina y la hormona liberadora del crecimiento (GHRH, siglas del inglés *growth hormone releasing hormone*) que ejercen un efecto inhibitor y estimulador sobre la secreción de GH (hormona del crecimiento, del inglés *growth hormone*) respectivamente. La hormona liberadora de la corticotrofina (CRH o CRF, del inglés *corticotropin releasing hormone* o

corticotropin releasing factor, respectivamente) secretada por el hipotálamo, estimula la liberación de la hormona adenocorticotrofa (ACTH, del inglés *adrenocorticotropic hormone*). La hormona liberadora de las gonadotrofinas (LHRH o GnRH, del inglés *luteinizing hormone releasing hormone o gonadotropin releasing hormone*, respectivamente; Schally y Bowers, 1964) secretada por el hipotálamo controla la secreción de la hormona estimulante del folículo (FSH, del inglés *follicle stimulating hormone*) y de la hormona luteínica (LH, del inglés *luteinizing hormone*) por la adenohipófisis (Belchetz et al., 1978; Crowley et al., 1985). La GnRH es sintetizada en el área preóptica del hipotálamo en los roedores y en el hipotálamo mediobasal y núcleo arcuato en primates (Stojilkovic et al., 1994). El patrón de secreción de la GnRH es diferente entre los dos sexos en roedores y primates, incluida la especie humana. En los machos adultos la GnRH es liberada en pulsos tónicos, mientras que en las hembras la secreción es de carácter cíclico, en relación con los ciclos reproductores en este sexo, pues existen pulsos de secreción que preceden a la ovulación (Plant y Marshall, 2001; Zeleznik y Plant, 2015). La hormona liberadora de la tirotrofina (TRH o TRF, del inglés *hyrotropin releasing hormone o thyrotropin releasing factor*, respectivamente), secretada por el hipotálamo, estimula las células tirotróficas de la pituitaria anterior para producir y liberar la hormona estimuladora del tiroides (TSH) (Toni y Lechand, 1993). La secreción de TRH es controlada por neuronas catecolaminérgicas y por neuropéptidos como la somatostatina y los péptidos opiáceos. La TRH tiene un efecto estimulador sobre la PRL hipofisaria (Tashjian et al., 1971; Blake, 1976) y, por otro lado, la dopamina hipotalámica inhibe la secreción de PRL (Ben-Jonathan, 1985).

HIPOTÁLAMO	ACCIÓN	ADENOHIPÓFISIS	FUNCIÓN
GHRH	+	GH	Estimula la síntesis de proteínas y el crecimiento.
Somatostatina	-		
CRH o CRF	+	ACTH	Estimula la síntesis y secreción de hormonas suprarrenocorticales.
LHRH o GnRH	+/-	FSH	♂ Estimula la maduración de espermatozoides en los testículos. ♀ Estimula el desarrollo folicular y la síntesis de estrógenos en los ovarios.
		LH	♂ Estimula la síntesis de testosterona en los testículos. ♀ Estimula la ovulación, la formación del cuerpo lúteo, la síntesis de estrógenos y progesterona en los ovarios.
Dopamina	-	PRL	Estimula la producción y secreción de leche en la mama.
TRH o TRF	+	TSH	Estimula la síntesis y secreción de hormonas tiroideas.
		PRL	

Tabla 1. Resumen de las hormonas hipofisiótropas y sus acciones/funciones en la regulación del sistema endocrino.

EJE HIPOTÁLAMO HIPÓFISARIO-GONADAL. Con la pubertad, los ovarios se activan produciendo una serie de secreciones hormonales cíclicas (ciclo menstrual) que en las hembras del género humano dura 28 días. El control de la función ovárica es llevado a cabo por las hormonas gonadotrópicas hipofisarias que incluyen a la LH, la FSH y la PRL (Treloar et al., 1967; Knobil, 1980; Hawkins y Matzuk, 2008). El hipotálamo puede modificar la frecuencia de pulsos de liberación de la GnRH para incrementar o disminuir los niveles de LH y FSH,

incluso controlarlas por separado (Crowley et al., 1985; Marshall et al., 1993; Kaiser, 1998) (Figura 2). Además, la magnitud de la respuesta es proporcional a los niveles plasmáticos de estrógenos que ejercen un efecto inhibitor sobre la liberación de gonadotrofinas por la hipófisis a través de un mecanismo de *retroalimentación negativa* (Chongthammakun y Terasawa, 1993; Shaw et al., 2010). Por otro lado, una alta concentración de estrógenos ejerce un mecanismo de *retroalimentación positivo*, estimulando la liberación de GnRH antes de la ovulación (Nakai et al., 1978; Ottowitz et al., 2008). Ambas gonadotrofinas, LH y FSH, presentan una actividad con valores basales o tónicos bajos y con un pico marcado durante la etapa ovulatoria (Filicori et al., 1986). En la fase folicular, donde se produce una proliferación del endometrio del útero, la FSH induce el desarrollo folicular y la síntesis de estradiol (Figura 2). Los estrógenos actúan sobre el hipotálamo modulando la secreción de GnRH y dopamina (Gill et al.; 2002) con lo que disminuyen los niveles de gonadotrofinas y estimulan la formación de receptores para FSH en el folículo, la producción de PRL y hacen a la hipófisis más sensible a su hormona estimulante hipotalámica, la GnRH (Hall et al., 1990; Taylor et al., 1995; Gill et al.; 2002). La LH es responsable de la ovulación, la maduración del oocito y la luteinización del folículo en cuerpo lúteo lo que incrementa la producción de progesterona que, a su vez, disminuye la frecuencia de liberación de la LH sin afectar a la FSH (Reame et al., 1984; Filicori et al., 1984) (Figura 2). En la fase lútea es donde el folículo se transforma en cuerpo lúteo, se produce un incremento de estrógenos acompañado de un incremento de los niveles de progesterona y, aunque los niveles estrogénicos permanecen altos durante toda la fase luteínica, no se produce liberación de LH y FSH por el bloqueo de la progesterona (Nippoldt et al., 1989; Soules et al., 1984; Filicori et al., 1984). La progesterona prepara el endometrio para la anidación y el embarazo y, si no se produce la fecundación del óvulo, el cuerpo lúteo se atrofia (Figura 2).

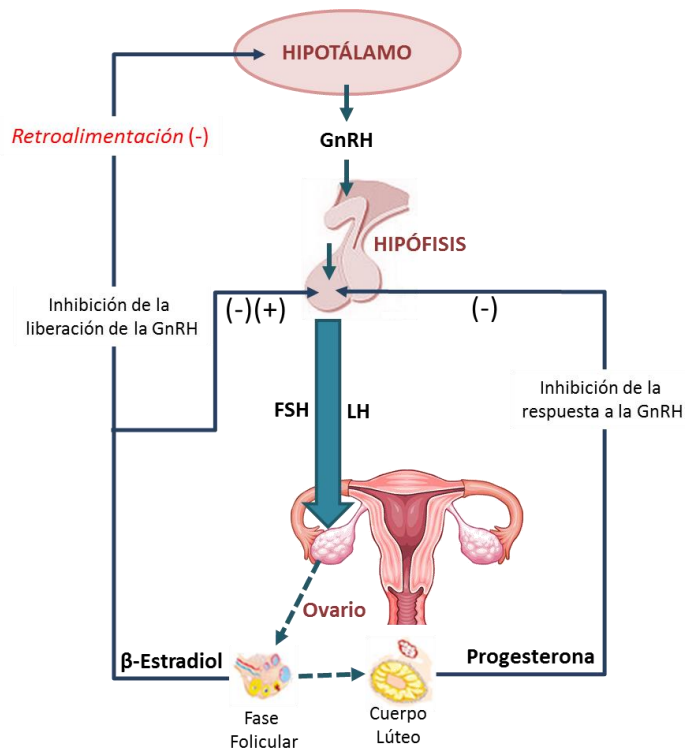


Figura 2. Regulación hormonal durante el ciclo menstrual. La liberación de GnRH por el hipotálamo estimula la adenohipófisis provocando la secreción de la FSH y la LH que actúan sobre el ovario. La FSH promueve el desarrollo de los folículos que liberan estrógenos hasta alcanzar un folículo dominante. Los estrógenos ejercen una retroalimentación negativa y positiva que regula la liberación pulsátil de la GnRH y la adenohipófisis, respectivamente. La LH estimula la ovulación y la conversión del folículo ovárico en cuerpo lúteo el cual produce progesterona.

En roedores existe esta regulación hormonal periódica que se conoce como ciclo estral. El ciclo estral dura entre 4-6 días y consta de 4 etapas, proestro, estro (8-12h), metaestro y diestro (Figura 3B). El aumento de la LH se produce al final de la fase del proestro, induciendo la ovulación unas 12 horas después, principio de la fase del estro. Después de la ovulación, las células del folículo ovárico se luteinizan lo que origina su transformación a cuerpo lúteo (McLean et al., 2012; Bellofiore et al., 2017).

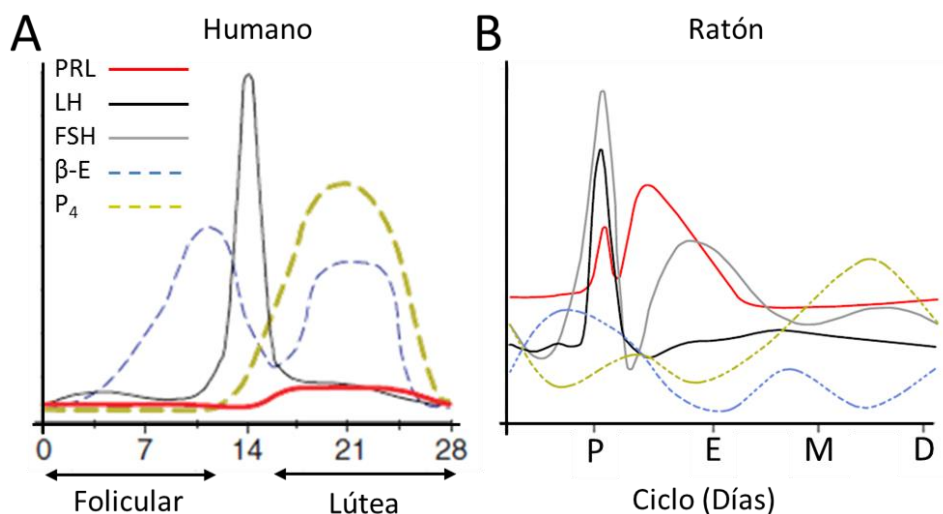


Figura 3. Cinética de la concentración de las principales hormonas involucradas en el ciclo reproductor. **A**, Representación de las concentraciones de las principales hormonas involucradas en el ciclo menstrual en humanos (modificado de Ben-Jonathan et al., 2008). **B**, Hormonas del ciclo estral en ratones, Proestro (P), Estro (E), Metaestro (M) y Diestro (D) (modificado de McLean et al., 2012). Prolactina (PRL), hormonas gonadotrópicas (LH y FSH), estrógenos (β -Estradiol, β -B) y progesterona (P_4).

En el caso de que se produzca la fecundación del óvulo, el blastocisto se implanta en el endometrio uterino gracias a la progesterona liberada por el cuerpo lúteo. Las células trofoblásticas que recubren el blastocisto y las células deciduales derivadas de la capa endometrial darán origen a la placenta (Chamley et al., 2014) que se reconoce como un órgano endocrino extremadamente activo (Talamantes y Ogren, 1988). Los trofoblastos segregan una hormona conocida como gonadotrofina coriónica humana (HCG, del inglés *human chorionic gonadotrophin*) que impide la regresión del cuerpo lúteo (Cole, 2010), en caso contrario, se iniciaría el ciclo menstrual. Con la implantación del blastocisto la síntesis del estradiol y la progesterona continúa para mantener la proliferación del endometrio y favorecer el embarazo (Figura 4). En el segundo trimestre, la placenta segrega grandes cantidades de progesterona, estrógenos y lactógeno placentario (PL, del inglés *Placental Lactogen*) para servir de apoyo al útero y estimular el

crecimiento y desarrollo de las mamas, preparándose para la lactancia (Imagawa et al., 1994; Stouffer, 2003; Andersson et al., 2008) (Figuras 4 y 5). Hacia el final del embarazo, se activa el eje hipotálamo-hipofisario-suprarrenal y la corteza suprarrenal fetal empieza a producir cantidades significativas de cortisol. Éste aumenta el cociente estrógeno/progesterona que regula la producción local de prostaglandinas incrementando la contractilidad del útero (Muttukrishna et al., 1996; Mesiano et al., 2002). La dilatación del cérvix, como ocurre durante la progresión del parto, estimula la secreción de oxitocina que es un potente estimulante de las contracciones uterinas (Fuchs et al., 1991; Blanks y Thornton, 2003; Russell et al., 2003). La oxitocina y la PRL tienen diferentes umbrales de activación y cinéticas por lo que su coliberación puede ser una coincidencia, aunque existen evidencias de que la PRL puede modular la liberación de oxitocina en determinadas condiciones (Kokay et al., 2006; Augustine et al., 2017).

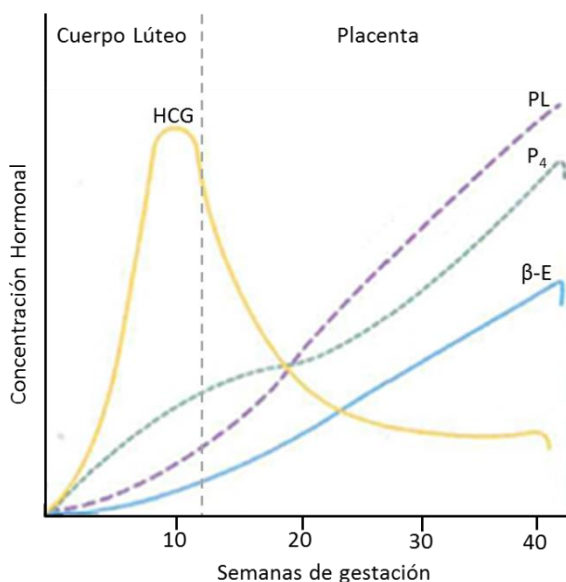


Figura 4. Relación de las concentraciones de las principales hormonas involucradas durante el embarazo en humanos. Gonadotropina coriónica humana (HCG), lactógeno placentario (PL), estrógenos (β -Estradiol, β -E) y progesterona (P_4). (modificado de Talamantes y Ogren, 1988).

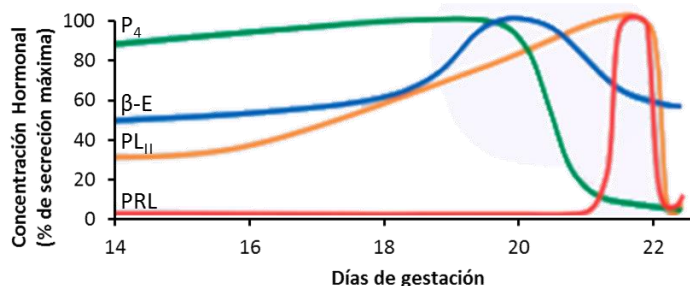


Figura 5. Relación de las concentraciones de las principales hormonas involucradas durante la gestación en ratón. Prolactina (PRL), lactógeno placentario (PL_{II}), estrógenos (β-Estradiol, β-E) y progesterona (P₄) (modificado de Grattan et al, 2008).

La gestación implica niveles sustancialmente elevados de estradiol y progesterona durante un período más largo que en el ciclo estral, lo que estimula la liberación de PRL por parte de la hipófisis anterior dando lugar a un incremento continuo de las concentraciones de PRL (Ben-Jonathan y Munsick, 1980; Handwerger, 1991). Tras el parto, cuando las concentraciones de estrógeno y progesterona caen drásticamente, sus efectos inhibidores sobre la PRL cesan permitiendo que esta hormona desarrolle su acción lactogénica sobre la mama. La lactancia se mantiene por la succión del pezón que estimula la secreción tanto de oxitocina como de PRL (Pan y Mai, 1990; Richard et al., 1991; Samson y Schell, 1995).

Si se elimina el funcionamiento ovárico, bien por la llegada del climaterio o por castración, disminuye el número de folículos ováricos funcionales, caen los niveles de estrógenos y las concentraciones circulantes de la LH y la FSH incrementan de forma evidente, con un mayor predominio de la segunda, y manteniendo su carácter de secreción pulsátil (Sharpless et al., 1999).

Prolactina. Mecanismos de regulación

La PRL es un polipéptido lineal de 199 aminoácidos con un peso molecular de 22-23KDa que pertenece a la familia de proteínas de la GH y los PL por su similitud estructural y propiedades biológicas (Soares, 2004). Denominada así por su principal papel en la lactancia, estimulando el desarrollo de la glándula mamaria y la producción de leche, la PRL presenta otras acciones importantes sobre el metabolismo, el crecimiento y el desarrollo, así como en la regulación del sistema inmune y la modulación de funciones neuroendocrinas en el adulto (Grattan y Kokay, 2008).

La PRL es producida y secretada principalmente por las células lactótrofas localizadas en la adenohipófisis, que constituyen entre un 20-50% de su población celular según el género y las condiciones fisiológicas (Halmi et al., 1975; Baker y Gross, 1978). Además, hay otros órganos y tejidos en los cuales la PRL se expresa y es secretada, como las mamas, el útero y la placenta (Walters et al., 1983; Andersen, 1990; Handwerger, 1991). Su liberación al torrente sanguíneo es regulada, principalmente, por el control inhibitorio de la dopamina producida por las neuronas dopaminérgicas tuberoinfundibulares (TIDA, del inglés *Tuberoinfundibular Dopamine*), localizadas en el núcleo arcuato del hipotálamo, que proyectan sus terminales axónicos a la eminencia media. La DA es liberada en los capilares del sistema porta hipotálamo-hipofisario para alcanzar los receptores dopaminérgicos D₂ en las células lactótrofas (Björklund et al., 1973; Reymond y Porter et al., 1985; Mansour et al., 1990) (Figura 6). La PRL actúa a través de un sistema de retroalimentación de asa corta para regular su propia liberación a través de la estimulación de las neuronas TIDA (DeMaria et al., 1999) (Figura 6). Por otro lado, existe un efecto directo por parte de diferentes neurotransmisores, neuromoduladores y hormonas periféricas sobre la actividad de las neuronas TIDA.

Los agentes inhibidores disminuyen la actividad de las neuronas TIDA lo que resulta un incremento de secreción de PRL, mientras que su estimulación disminuye la secreción de PRL (Freeman et al., 2000). Entre los que ejercen un estímulo excitador destacamos la oxitocina, vasopresina, TRH, acetilcolina, neurotensina, calcitonina, glutamato y PRL. Por otro lado, ejercen un efecto inhibidor la serotonina, norepinefrina, histamina, opioides endógenos, somatoestatina, GABA, el óxido nítrico y los estrógenos (Freeman et al., 2000). El neurotransmisor GABA actúa a través de receptores GABA_A regulando la actividad neuronal TIDA y contribuye a un incremento de la secreción de PRL (Caligaris et al., 1974). Se ha observado un abundante plexo nervioso GABAérgico en la eminencia media y una sólida inervación GABAérgica de los núcleos hipotalámicos paraventriculares y supraópticos (Theodosios et al., 1986; Meister et al., 1988) los que se consideran sensibles a los efectos mediados por factores de liberación de PRL (PRF, del inglés *Prolactin-Releasing Factor*) (Neill y Nagy, 1994). Por otro lado, se ha demostrado que el sistema glutamatérgico endógeno tiene un importante papel en el aumento de PRL inducido por la succión del pezón y en prolongar sus altas concentraciones durante la lactancia (Zelena et al., 2003).

Al igual que las neuronas TIDA, las neuronas del núcleo paraventricular del hipotálamo también proyectan terminales a la eminencia media donde secretan TRH al torrente sanguíneo para alcanzar las células lactótrofes y unirse a su receptor tipo 1 (Tashjian et al., 1971; Noel et al., 1974). Esta hormona tiene un efecto estimulante sobre la liberación de PRL cuando no hay presencia de dopamina o su concentración es baja (Figura 6). La unión de la TRH a su receptor provoca un rápido aumento de calcio intracelular que produce un aumento de liberación de PRL y la inducción del gen de PRL mediante la vía de señalización mediada por la PKC (proteína quinasa C, del inglés, *Protein Kinase C*) y la activación calcio dependiente de la MAPK (quinasas activadas por mitógenos, del

inglés, *Mitogenic-Activated Protein Kinases*) (Pfleger et al., 2004; Rabeler et al., 2004; Kanasaki et al., 2015).

El receptor de PRL es una única proteína unida a la membrana que pertenece a la familia de receptores citoquinas tipo 1. Se han descrito tres isoformas del receptor de PRL, una forma larga (PRLR-L), una intermedia (PRLR-I en roedores = S1a en humanos) y una corta (PRLR-S en roedores = S1b en humano) (Boutin et al., 1988; Bole-Feysot et al., 1998; Ben-Jonathan et al., 2008). Existen tres regiones promotoras del receptor de PRL; el promotor I específico de las gónadas, el promotor II para el hígado y el promotor III que es genérico y se encuentra en ambos tejidos (Hu et al., 1998). Los receptores de PRL están ampliamente distribuidos en el organismo (tejido óseo, linfoide, hígado, gonadal, páncreas) y áreas del SNC (hipotálamo, amígdala, plexos coroideos, hipocampo, bulbo olfatorio) (Ben-Jonathan et al., 1996; Pi y Grattan, 1998). Cuando la PRL se une a su receptor provoca su dimerización, lo que inicia la activación de una tirosina quinasa denominada Janus quinasa 2 (JAK-2, del inglés *Janus Kinase*) quien, a su vez, fosforila una familia de proteínas denominadas STAT (del inglés *Signal Transducer and Activator of Transcription*; Jabbour et al., 1998). Se han identificado ocho miembros de la familia de las proteínas STAT de las cuales STAT1, STAT3 y, especialmente, STAT5 han sido identificadas como moléculas de transducción del receptor de PRL (Goffin et al., 1998; Jabbour et al., 1998). JAK2, STAT3 y STAT5 se expresan en neuronas de la hormona liberadora de gonadotropina (GnRH) y median la señalización de citoquinas (Magni et al., 2007). En ratones deficientes de JAK2 en neuronas específicas GnRH, se reduce el nivel secretado de esta hormona y, como consecuencia, se produce un deterioro del desarrollo reproductivo y la fertilidad en ratones hembra, lo que sugiere un papel importante de JAK2 en el control de la producción de GnRH (Wu et al., 2011). El receptor de PRL también promueve la activación de otras quinasas como MAPK

(Das y Vonderhaar, 1995), Src quinasa (Wu et al., 2003), PI3K (Berlanga et al., 1997), PKC y PKA (Grattan y Kokay, 2008).

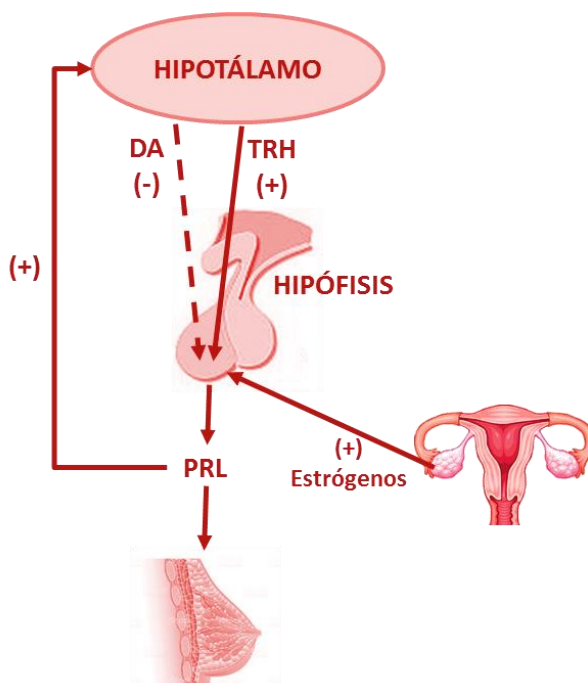


Figura 6. Regulación de la secreción de PRL. Las células lactótrofas de la adenohipófisis, donde se sintetiza y secreta la PRL hipofisaria, son reguladas por factores inhibidores y excitadores de la PRL (PIF, del inglés *Prolactin-Inhibiting Factor* y PRF, del inglés *Prolactin-Releasing Factor*; respectivamente). El principal PIF es la dopamina (DA) que modula la producción de PRL. Las concentraciones elevadas de PRL incrementan la secreción de PIF y originan la inhibición de la secreción de PRL por retroalimentación. Los estrógenos y la TRH (PRF) estimulan la secreción de PRL.

Como podemos observar en la representación de la figuras 7 y 8 las concentraciones de PRL cambian según las distintas condiciones fisiológicas, género y a lo largo del desarrollo humano.

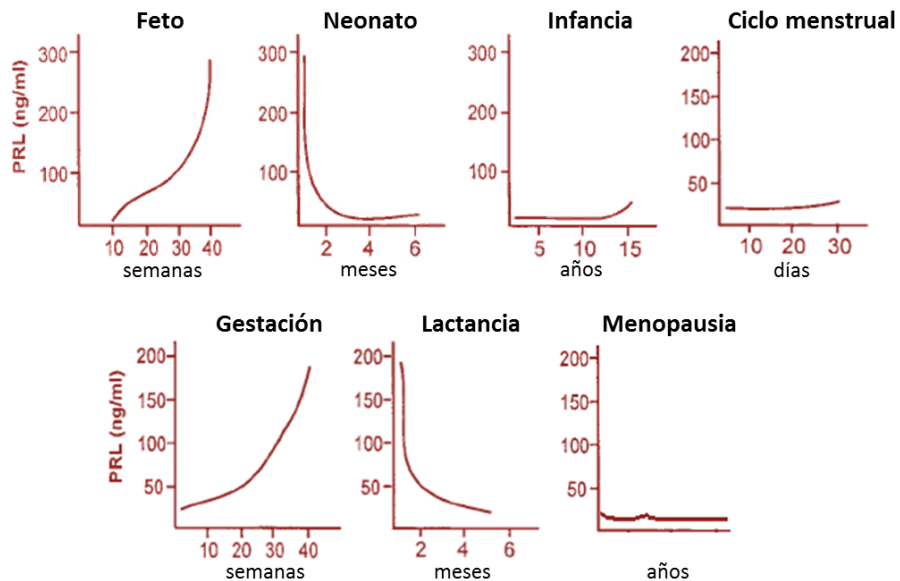


Figura 7. Representación gráfica de los niveles de PRL en humanos bajo diversas condiciones fisiológicas. Sus concentraciones se elevan durante el desarrollo fetal, la gestación y en el periodo de posparto con la lactancia. Los niveles mostrados son aproximados y no reflejan cambios agudos tales como variaciones diurnas o subidas inducidas por la succión (modificado de Ben-Jonathan y Hnasko, 2001).

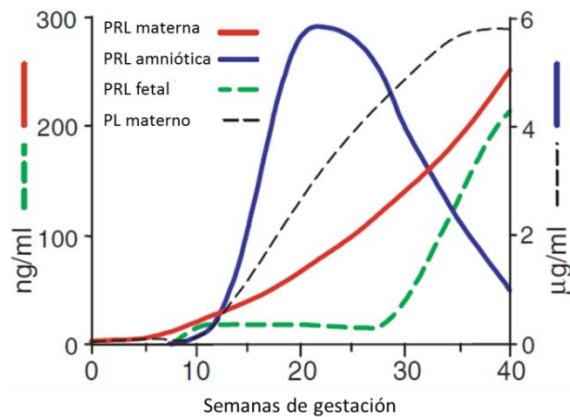


Figura 8. La PRL en suero materno aumenta gradualmente, de la semana 6 a la 8 de gestación hasta el final, mientras que se observa un aumento pronunciado en la PRL de suero fetal desde la semana 30 al término. La PRL producida por la decidua comienza a acumularse en el líquido amniótico a la semana 10 y llega a alcanzar niveles tan altos como 5 µg/mL durante la etapa media de la gestación, antes de disminuir a 500 ng/mL al término. El PL materno aumenta simultáneamente con la PRL decidual pero alcanza un pico de unos 6 µg/mL antes del parto. (modificado de Ben-Jonathan et al., 2008).

En roedores, la mayor secreción de PRL en el ciclo estral ocurre en la tarde del proestro (Gay et al., 1970; Neill, 1970) (Figura 9).

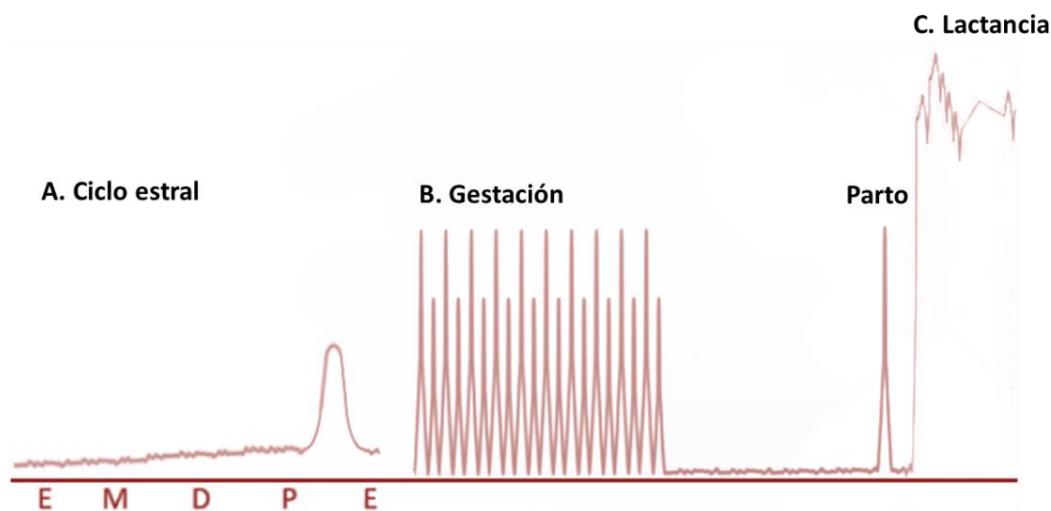


Figura 9. Patrón de secreción de la PRL para las diferentes etapas del ciclo reproductivo en ratón. **A**, en hembras nulíparas los niveles de PRL se mantienen bajos durante la mayoría del ciclo estral con un pico significativo entre el proestro y el estro. **B**, durante la primera etapa de gestación se produce en roedores una liberación pulsátil de PRL hipofisaria, estos niveles disminuyen a mitad de la gestación hasta la noche previa al parto. **C**, durante la lactancia la PRL actúa como un sensor fisiológico que responde a la demanda de producción de leche. El aumento de PRL puede ejercer una retroalimentación negativa sobre las neuronas TIDA. (modificado de DeLeon et al., 1990; Grattan et al., 2008, Larsen y Grattan, 2010).

Como se ha comentado anteriormente la gestación y la lactancia son los estímulos más importantes para la secreción de PRL. Durante la gestación el aumento de estrógenos produce una liberación progresiva de PRL hipofisaria y las neuronas TIDA presentan una actividad baja (Andrews, 2005). Además, existe un aumento de PL liberado por la placenta que es homólogo a la PRL (Lee et al., 1999) y también, de PRL decidual liberada por el endometrio uterino que es regulada por la progesterona y que se acumula en el líquido amniótico (Riddick et al., 1978; Jabbour y Critchley, 2001) (Figura 8, humanos y Figura 5 y 9, roedores). Igualmente, se conoce que existe un aumento de la PRL fetal pero no hay

evidencias de que exista una transferencia entre la madre y el feto o viceversa (Figura 8). La PRL es esencial para el soporte de la acción luteotrópica que promueve la producción de progesterona y mantiene la gestación (Figura 9). Previo al parto, se observa un pico brusco de los niveles de PRL que regula su liberación por un mecanismo de realimentación negativa (Grattan y Averill, 1990) (Figura 9). La producción de leche en mujeres comienza a los 2 días del parto, a pesar de que ya existe una concentración alta de PRL, cuando se produce la caída de los niveles de progesterona que inhiben la lactancia (Ben-Jonathan et al., 1977). La lactancia es el estímulo fisiológico más potente y mejor caracterizado para la liberación de PRL en humanos. La succión del pezón inhibe la liberación de dopamina lo que se traduce en un aumento de la concentración de PRL y, al igual que ocurre durante la gestación, la actividad de las neuronas TIDA es reducida a pesar de los niveles altos de PRL (Demarest et al., 1983b). A medida que la lactancia continúa, hay una supresión de la ovulación debido a que la PRL inhibe la secreción de GnRH por el hipotálamo y en consecuencia disminuye la secreción de FSH y LH por la adenohipófisis (Keye y Jaffe, 1976; Baird et al., 1979). Sin la estimulación del pezón, los niveles basales de PRL permanecen elevados durante las primeras 2-3 semanas después del parto y luego disminuyen (Ben-Jonathan et al., 1977).

No existen evidencias claras de la influencia de la PRL en el proceso reproductivo en condiciones fisiológicas en el humano (Ben-Jonathan et al., 2008). Por el contrario, se conoce que en condiciones patológicas de hiperprolactinemia se produce infertilidad, impotencia u otras alteraciones reproductivas tanto en hombres como en mujeres, lo que apunta a una posible contribución de la PRL en la fertilidad en humanos (Ben-Jonathan et al., 2008).

Efectos de la Prolactina sobre el Sistema Nervioso

En el SNC, la PRL está implicada en funciones diversas tales como la modulación de las propiedades electrofisiológicas de neuronas hipotalámicas (Kokay et al., 2006), la estimulación del comportamiento maternal (Bridges et al., 1990) y la supresión de las respuestas al estrés (Torner et al., 2001). Además, se ha descrito que la administración periférica y central de PRL (Shingo et al., 2003), su secreción inducida por feromonas (Mak et al., 2007) o las condiciones de estrés crónico (Torner et al., 2009), incrementan la neurogénesis en el adulto en la zona subventricular. Se ha asociado, también, la señalización de PRL con la neurogénesis en el bulbo olfatorio y el hipocampo parental (Mak y Weiss, 2010). Por otra parte, la PRL ha sido identificada como un regulador de la proliferación astrogliar (DeVito, et al., 1992), de progenitores de oligodendrocitos (Gregg et al., 2007) y de neuroesferas aisladas de la zona subventricular de ratón (Shingo et al., 2003). Además, concentraciones fisiológicas de PRL estimulan un incremento de Ca^{2+} intracelular capaz de provocar varias respuestas fisiológicas como el estímulo de proliferación de células de astrocitoma humano en cultivo (Ducret et al., 2002).

Si bien, como ya se mencionara, los receptores de PRL están ampliamente distribuidos en el organismo y áreas del SNC (Ben-Jonathan et al., 1996; Pi y Grattan, 1998), incluso en el hipocampo (Nogami et al., 2007; Torner et al., 2009), un aspecto poco estudiado de la PRL en el SN es su participación en la regulación de la actividad neuronal o la transmisión sináptica. En condiciones de hiperprolactinemia, aumenta la actividad de neuronas GABAérgicas del hipotálamo (Felman y Tappaz, 1989). Por otro lado, hay evidencias de que durante la gestación existe una expresión específica del receptor de PRL en neuronas GABAérgicas del hipotálamo (Kokay et al., 2011) y que aumenta la excitabilidad neuronal en determinadas regiones del cerebro debido a modificaciones en la expresión del

receptor GABA_A (Maguire et al., 2009). Además, se ha descrito un incremento de la actividad de neuronas GABAérgicas y de los niveles de GABA en el líquido cefalorraquídeo durante el periodo de lactación (Qureshi et al., 1987; Kornblatt y Grattan, 2001). Todos estos estudios, sustentan la posibilidad de que niveles altos de PRL pueden modificar el sistema inhibitor GABAérgico.

Recientes estudios indican que ratones deficientes de PRL muestran alteraciones en las tareas relacionadas con la memoria y el aprendizaje y está reducido el número de precursores en el hipocampo, poniendo de manifiesto la participación de la PRL en la estimulación de la neurogénesis en el hipocampo adulto (Walker et al., 2012). Otra función importante de la PRL en el SNC es su papel en la neuroprotección y la disminución del daño celular en áreas del hipocampo en modelos de epilepsia (Tejadilla et al., 2010; Morales et al., 2014), lo cual sugiere que podría modular señales de entrada al hipocampo y así regular la excitabilidad. Además de la síntesis de PRL en la adenohipófisis, su expresión (Clapp et al., 1994) y liberación local ocurre en diversas regiones del cerebro incluyendo el hipotálamo (Torner et al., 1995), por ejemplo, dentro del núcleo paraventricular (Torner et al., 2004). No obstante, se desconoce si el efecto que ejerce la PRL de origen neural es como neurotransmisor, neuromodulador, o como una citoquina central que regula el crecimiento vascular y/o las funciones gliales. Asimismo, la PRL puede cruzar la barrera hematoencefálica transportada en el líquido cerebroespinal (Nicholson et al., 1980) y difundirse a numerosas regiones del cerebro a través de uniones en las células epiteliales de los plexos coroideos (Walsh et al., 1987; Mangurian et al., 1992, Redzic et al., 2005) donde existe una alta densidad del receptor de PRL (Pi y Grattan, 1998). Además, se conoce que la expresión de receptor de PRL en los plexos coroideos es notablemente superior durante la gestación y el periodo de lactancia (Augustine et al., 2003), lo que nos

puede indicar una mayor probabilidad de que bajo estas condiciones la PRL puede acceder a diferentes zonas del cerebro.

Si bien los valores de PRL se mantienen bajos y estables durante el ciclo menstrual respecto a las otras hormonas, adquiere un papel protagónico en la maternidad por su importante participación durante la gestación y la lactancia (Figura 7, 8 y 9) que se correlaciona con modificaciones en el comportamiento maternal, cambios plásticos y morfológicos en el cerebro (Grattan, 2002). Se conoce que las hormonas involucradas en la gestación así como la estimulación de la camada, son capaces de alterar la concentración de espinas dendríticas en la región de CA1 del hipocampo en ratas (Kinsley et al., 2006). Se ha demostrado que animales modificados genéticamente a los que se les ha suprimido el receptor de PRL muestran una carencia en el cuidado maternal (Lucas et al, 1998). Además, la administración de PRL en ratas tratadas con esteroides acelera el inicio del comportamiento maternal (Bridges et al., 1985; 1990) y, por el contrario, esta conducta se retrasa cuando se bloquea la secreción de PRL con bromocriptina, un agonista selectivo del receptor de dopamina D₂ (Bridges et al., 1990). Las acciones estimuladoras que la PRL ejerce sobre el comportamiento maternal se corresponden con las que realiza el PL (Demarest et al., 1983a; Bridges et al., 1996; 1997).

El cerebro materno es extremadamente flexible y esta plasticidad contribuye a un conjunto de aptitudes que aseguran el cuidado, la protección y la supervivencia de la camada pero los mecanismos celulares y circuitales subyacentes permanecen elusivos. Dado que el papel de la PRL sobre la plasticidad sináptica es desconocido y que, sin lugar a duda, cumple un rol fundamental en el desarrollo de esta conducta, una mejor comprensión de cómo actúa la PRL a nivel sináptico puede ayudarnos a conocer los mecanismos celulares responsables de estos cambios (Figura 10).

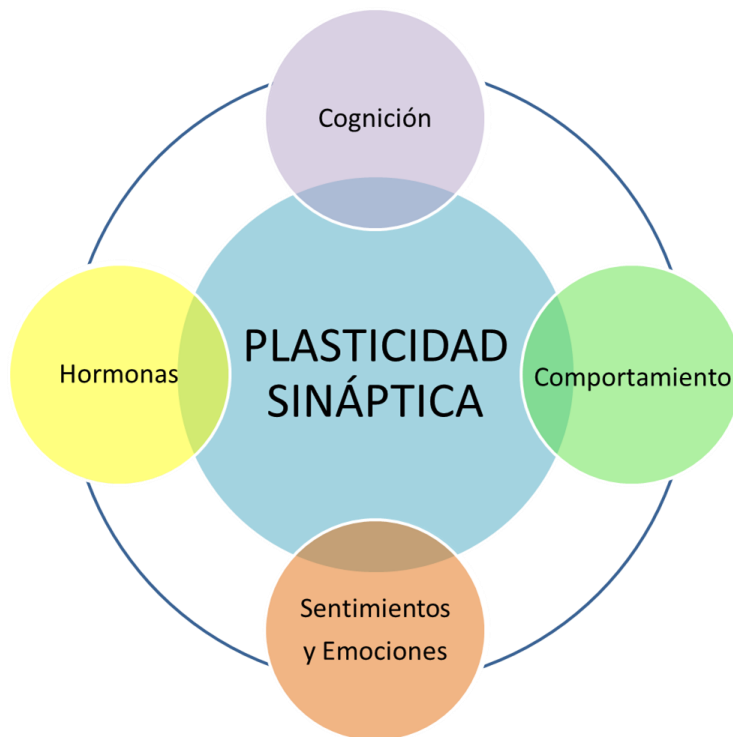


Figura 10. La plasticidad sináptica es una propiedad fundamental del sistema nervioso que le permite modificar su estructura y función necesarias para cambiar y adaptarse al medio externo e interno. Las hormonas regulan estos cambios plásticos en el cerebro influyendo en los sentimientos, las emociones, la cognición y el comportamiento. (modificado de García-Segura, 2009).

Hipótesis

La capacidad del SN de modificar su organización estructural y funcional para crear nuevas conexiones y dar origen a nuevos circuitos se debe a una propiedad denominada plasticidad neuronal. Dada la complejidad de estos fenómenos, muchos aspectos de su fisiología no son aún bien comprendidos y teniendo en cuenta su importancia tanto en la fisiología como en la patología del sistema nervioso, es necesario profundizar en aspectos aún no explorados. Datos previos indican que el SE ejerce una importante influencia sobre la plasticidad del sistema nervioso y, en particular, el éxito de la supervivencia de los mamíferos depende de las adaptaciones que ocurren en el cerebro de la madre a lo largo de la gestación, parto, lactancia y cuidados postnatales. Dentro del cúmulo de hormonas que participan en estos procesos, la Prolactina desempeña un importante papel pero es una de las hormonas menos estudiadas en cuanto a los posibles cambios plásticos que pueda producir en el SN. Por lo tanto, planteamos como hipótesis de trabajo que la PRL está involucrada en la regulación de la plasticidad sináptica del hipocampo a través de mecanismos mediados directa o indirectamente por su receptor específico el que, a su vez, activa distintas vías de señalización intracelulares, a nivel pre o post-sináptico, lo que podría permitir la consolidación de la plasticidad sináptica a corto y/o largo plazo en procesos fisiológicos o patológicos.

Objetivos

Objetivo general

El objetivo general del presente trabajo de tesis consiste en estudiar los mecanismos celulares, circuitales y los posibles receptores sinápticos involucrados en los cambios plásticos sinápticos inducidos por la prolactina en el hipocampo.

Objetivos específicos

El objetivo general propuesto se llevará a cabo a través de la consecución de los siguientes objetivos específicos:

OBJETIVO 1. Caracterizar los fenómenos plásticos sinápticos a corto y largo plazo (LTP) en el hipocampo inducidos por la prolactina.

OBJETIVO 2. Determinar los posibles mecanismos pre o post-sinápticos involucrados en los cambios plásticos observados.

OBJETIVO 3. Investigar si los cambios plásticos sinápticos y circuitales mediados por la prolactina se observan en ausencia del control del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal.

MATERIALES Y MÉTODOS

2.1.- Animales

2.2.- Electrofisiología

2.3.- Técnicas quirúrgicas

2.4.- Grupos Experimentales

2.5.- Fármacos

2.6.- Análisis de los datos

Animales

Para la realización de los experimentos se han utilizado ratones de ambos sexos de la cepa no consanguínea RjHan/NMRI, con una edad comprendida entre 8 y 12 semanas. Suministrados por Janvier Labs (Le Genest-Saint-Isle, Francia). Los animales se mantuvieron en condiciones controladas de temperatura (20-24°C), humedad, presión atmosférica y flujo de aire. Con ciclos establecidos de 12 horas de luz y 12 horas de oscuridad y con libre acceso a comida y agua.

Todos los procedimientos experimentales se llevaron a cabo bajo la aprobación de la Dirección General de Agricultura y Ganadería de la Consejería de Agricultura de Castilla-La Mancha (**Ref. 1036620**). Se ha procurado en todo momento la reducción de animales, reemplazar los modelos en la medida de lo posible y el refinamiento de los protocolos para evitar lo máximo posible el sufrimiento de los animales.

2.2.1.- Preparación de rodajas de cerebro

Los animales fueron decapitados y el cerebro fue extraído rápidamente manteniendo el tejido continuamente en contacto con líquido cefalorraquídeo artificial (aCSF, del inglés *artificial Cerebrospinal Fluid*; Tabla 1) a 4 °C (Martín et al., 2001). Se realizaron cortes coronales de 350-400 µm con un vibrátomo (Vibratome Series 3000 Plus, St. Louis, MO 63134) y se mantuvieron incubados en una cámara con aCSF burbujeado con un 95 % de O₂ y 5 % de CO₂ (carbógeno) a temperatura ambiente (22-24 °C, RT, del inglés *room temperature*) y un pH entre valores de 7.3 y 7.4 durante al menos 1 h antes de registrar.

aCFS							
Reactivo	NaCl	KCl	KH ₂ PO ₄	MgSO ₄	NaHCO ₃	C ₆ H ₁₂ O ₆	CaCl ₂
[mM]	124	2.69	1.25	2	26	10	2

Tabla 1. Solución de líquido cefalorraquídeo artificial para la supervivencia de las rodajas.

Con el fin de mejorar la supervivencia de las células y, por consiguiente, la calidad de los registros en los experimentos realizados con técnica de patch-clamp, las rodajas se obtuvieron cortando el cerebro con una solución aCSF (Tabla 2) rica en N-Methyl-D-Glucamine (NMDG) a 4 °C. Posteriormente se mantuvieron durante 15 min a 34 °C en esta misma solución antes de ser incubadas en la solución aCFS estándar (Tabla 1) a RT. En ambos casos las soluciones estuvieron constantemente burbujeadas con carbógeno y un pH ajustado a 7.3-7.4. Estudios previos han demostrado que el NMDG tiene un efecto neuroprotector ya que aporta cationes orgánicos metilados (Ting et al., 2014).

aCFS TING											
Reactivo	NMDG	KCl	NH ₂ PO ₄	NaHCO ₃	HEPES	Glucosa	Ascorbato de Na ⁺	Thiourea	Piruvato de Na ⁺	MgSO ₄ ·7H ₂ O	CaCl ₂ ·2H ₂ O
[mM]	93	2.5	1.2	30	20	25	5	2	3	10	0.5

Tabla 2. Solución de líquido cefalorraquídeo artificial para los estudios con la técnica patch-clamp.

2.2.2.- Registros electrofisiológicos extracelulares

Las rodajas se transfirieron a una cámara de registro de inmersión y se perfundieron con aCFS burbujeadado con carbógeno a un flujo constante de 2 mL/min, manteniendo un volumen de 200 μ L, a una temperatura de 30-32 °C controlada a través de un regulador automático de temperatura (Modelo TC-324B, Warner Instruments Corp. Hamden, CT, U.S.A). Se registraron potenciales sinápticos excitatorios de campo (fEPSP, del inglés *field Excitatory PostSynaptic Potential*) en el *stratum radiatum* de la capa piramidal en la región de CA1 del hipocampo, posicionando un microelectrodo de registro de fibra de carbono (Carbostar-1, Kation Scientific, Minneapolis, U.S.A.) con un rango de impedancia de 0.4-1.2 M Ω . Los fEPSP se obtuvieron al estimular las fibras colaterales de Schaffer con un electrodo bipolar de tungsteno aislado con parylen (distancia interelectródica 90-125 μ m) con un diámetro en el extremo de 1 μ m e impedancia 0.5 M Ω , posicionado en el SR. Se aplicaron pulsos de estimulación monofásicos de 50 μ s de duración, a distintas intensidades y frecuencias según el protocolo para cada condición experimental, a través de una unidad de aislamiento comandada por un estimulador (A-M SYSTEM, Isolated Pulse Stimulator, Model 2100, Inc., Carlsborg, WA, U.S.A.).

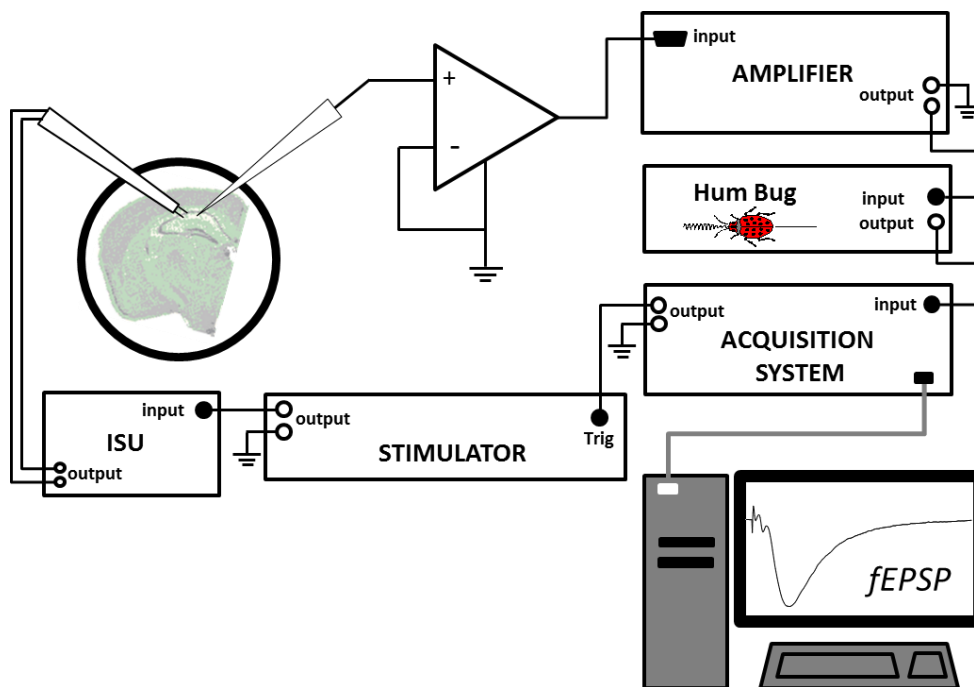


Figura 11. Diagrama de bloques del sistema de registro extracelular en rodajas de cerebro. El fEPSP se capta con un electrodo de registro conectado a una etapa de preamplificación (ganancia x1). Posteriormente la señal es tratada con un filtro pasa-banda (0.1-3 KHz) y amplificada (ganancia x1000) para luego filtrarse nuevamente a través de un dispositivo tipo Hum Bug para eliminar la interferencia de 50 Hz procedente de distintas fuentes. Finalmente, mediante el sistema de adquisición de datos (que consta de un conversor analógico/digital) conectado al ordenador podemos visualizar nuestro fEPSP. El sistema de adquisición está conectado al estimulador/unidad de aislamiento (ISU) para poder sincronizar el pulso de estimulación con el registro de la señal y obtener, de esta manera, el potencial de campo sináptico.

La transmisión sináptica basal se estudió aplicando un pulso de duración constante (50 μ s) a intensidades de: 0.5, 1, 1.5, 2, 2.5, 3, 3.5, 6, 7, 8, 9 y 10 V cada 5 s. Para la realización de los distintos protocolos experimentales se estableció una intensidad de estimulación correspondiente al 40-60 % del valor umbral máximo de la pendiente del fEPSP. Para determinar el origen pre o post-sináptico de los fenómenos observados y estudiar los posibles cambios plásticos sinápticos a corto plazo, se utilizó el paradigma de la facilitación por pares de pulsos (PPF, del inglés *Paired-Pulse Facilitation*) aplicando un protocolo de estimulación a diferentes

intervalos (15, 30, 50, 75, 100, 150, 300 y 500 ms) y una frecuencia 0.06 Hz. Los cambios plásticos sinápticos a largo plazo se estudiaron empleando un protocolo clásico de estimulación de trenes de pulsos TBS (del inglés *Theta-Burst Stimulation*). Para ello, una vez estables los valores de la pendiente del fEPSP, se realizó un registro basal de 10 min y se aplicó un tren de 5 ráfagas de 100 Hz y 50 ms de duración, separadas por intervalos de 200 ms (Figura 12).

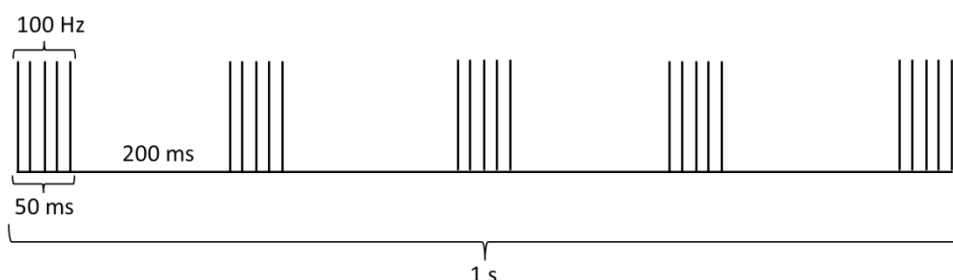


Figura 12. Representación descriptiva del protocolo tetanización de TBS.

2.2.3.- Registros con la técnica de patch-clamp en modalidad de célula entera

Las rodajas se transfirieron a una cámara de registro donde se perfundieron (2 mL/min) con aCSF burbujeado con carbógeno (Tabla 1) a temperatura ambiente (21-23 °C). Las células fueron identificadas visualmente con un microscopio vertical de platina fija BX51WI (Olympus, Tokyo, Japón) equipado con una óptica infra roja (IR) Nomarski y un objetivo de inmersión 40x acoplado a una cámara CCD y a un monitor de vídeo. Se realizaron registros de las neuronas piramidales del hipocampo de la región de CA1 teniendo en cuenta su localización en la capa piramidal y sus propiedades electrofisiológicas (Martín et al., 2001). Los electrodos de registro se fabricaron con capilares de vidrio de borosilicato (1B150F-4, WPI, Sarasota, FL) con un estirador de pipetas tipo Brown-Flaming modelo P-97 (Sutter Instruments, CO, U.S.A.). Las micropipetas tenían una impedancia entre 4 y 8 MΩ

cuando se rellenaban con las distintas soluciones intracelulares ajustadas a un pH de 7.3 y una presión osmótica entre 280-290 mOsm (Tabla 3 y 4). Para registrar corrientes post-sinápticas (*PSC*, del inglés *PostSynaptic Current*) en fijación de voltaje y PA en fijación de corriente se utilizó la solución intracelular descrita en la tabla 3. En los experimentos donde los componentes AMPA y NMDA de las corrientes glutamatérgicas se aislaron por dependencia del voltaje ($V_H = -60$ mV y $V_H = +60$ mV, respectivamente) el gluconato de K^+ fue sustituido por CsCl (Tabla 4), para un mejor control espacial del potencial de membrana (V_m).

Solución Intracelular (pH ajustado con KOH [1M])							
Reactivo	K-gluconate	KCl	EGTA	HEPES	MgCl ₂	Na ₂ GTP	Na ₂ ATP
[mM]	100	32.5	5	10	1	0.4	4

Tabla 3. Solución intracelular de los electrodos de registro en modalidad de célula entera, PSC.

Solución Intracelular (pH ajustado con CsOH [1M])							
Reactivo	CsCl	QX314 Br	EGTA	HEPES	MgCl ₂	Na ₂ GTP	Na ₂ ATP
[mM]	135	2	2.5	10	2	0.2	2

Tabla 4. Solución intracelular de los electrodos de registro en modalidad de célula entera, PSC.

Los registros se obtuvieron con un amplificador MultiClamp 700A (Axon Instruments, Union City, CA), filtrando las señales a 2 KHz (filtro paso-bajo) y digitalizándolas a través de un conversor analógico/digital DigiData 1440 A (Axon Instruments).

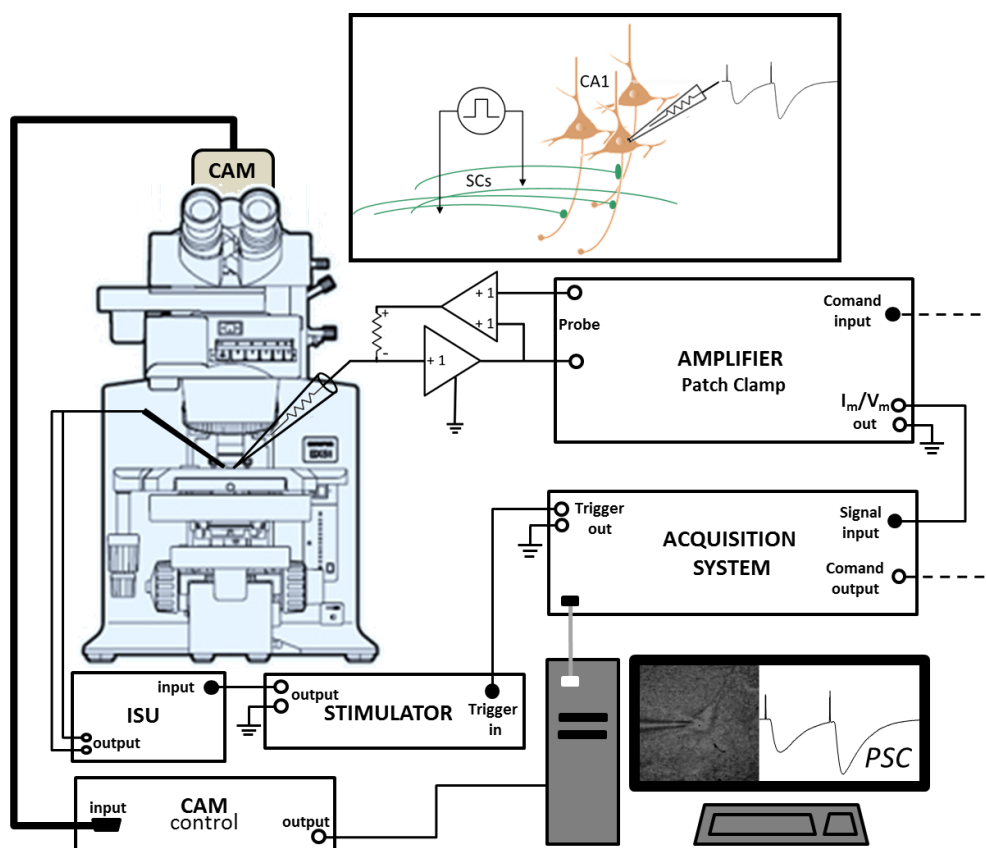


Figura 13. Diagrama de bloques del sistema de registro de “*patch-clamp*” en la modalidad de célula entera en rodajas de cerebro. Una vez el electrodo de registro tiene acceso al interior de la célula es posible medir una PSC. La señal pasa al amplificador de patch-clamp que nos permite ajustar los parámetros involucrados en el circuito (R_s , C_m , V_m) para optimizar las características del registro. La señal es monitorizada a través del convertor analógico/digital del sistema de adquisición de datos y el ordenador. Tanto para los experimentos de fijación de voltaje como de fijación de corriente, el amplificador es comandado por un pulso de voltaje o de corriente controlado por el sistema de adquisición de datos a través de una salida analógica. Todo el proceso se realiza mediante la visualización de la célula gracias a un microscopio equipado con objetivos de inmersión, óptica Nomarski y una cámara infrarroja que se conecta al ordenador. En el inserto de la parte superior se muestra un esquema ilustrativo de las condiciones experimentales para obtener un registro de las PSCs de CA1 tras estimular las SCs en una rodaja de hipocampo

Las PSCs de las neuronas de CA1 se adquirieron utilizando la técnica de fijación de voltaje manteniendo el potencial de membrana a -60 mV y estimulando las SCs, tal como se describió en el apartado anterior de registro extracelular. Se

neutralizaron tanto las capacidades rápidas como las lentas y se compensó la resistencia en serie (R_s , ~70%). Sólo se consideraron aquellas células cuya R_s no cambió más de un 12% durante todo el experimento.

Para el estudio de la plasticidad sináptica a corto plazo se realizó un protocolo de PPF, donde se aplicaron dos pulsos de estimulación a diferentes intervalos, de 20 a 160 ms, en incrementos de 20 ms y a una frecuencia de 0.2 Hz promediando 5 trazos. El protocolo de PPF fue configurado con el software pCLAMP 10.2 (Axon Instruments).

Para estudiar la excitabilidad de las neuronas de CA1 se realizaron registros de PA en fijación de corriente aplicando pulsos de 500 ms de duración para diferentes incrementos de amplitud de 10 a 300 pA en función de la excitabilidad de la célula para cada caso en particular, repitiendo la serie de pulsos 4 veces para la misma condición.

2.2.4.- Registros extracelulares *in vivo*

Para obtener registros de fEPSP de neuronas de CA1 en animal vivo, éstos fueron anestesiados con una inyección intraperitoneal de uretano [1.8 g/Kg] con un volumen de solución salina 10 mL/Kg. Se les rasuró la cabeza y se desinfectó la piel. El animal se fijó a un marco estereotáxico y se mantuvo a una temperatura controlada de 37 °C a través de una manta térmica conectada a un regulador de temperatura HB101/2 (Panlab, Conellia, Barcelona, España). Se practicó una incisión longitudinal en la piel para acceder al cráneo, se limpió con solución salina y se eliminó el tejido conectivo. Posteriormente, se realizaron trepanaciones en el cráneo para posicionar el electrodo de registro en el SR de la región de CA1 (-2.2 mm antero-posterior, ± 1.1 mm lateral) y los electrodos de estimulación en las SCs (-1.5 mm antero-posterior y ± 2 mm lateral, con una inclinación de 5°). Las coordenadas se establecieron en base al atlas de Paxinos y Franklin (2001) utilizando el Bregma como referencia. Para registrar los potenciales de campo de

las neuronas de CA1 se utilizaron electrodos de tungsteno de $2\text{ M}\Omega$ ($\varnothing 1\text{ }\mu\text{m}$) y para estimular las SCs un electrodo bipolar de tungsteno con una impedancia de $0.5\text{ M}\Omega$ ($\varnothing 1\text{ }\mu\text{m}$), y una separación interelectródica de $500\text{ }\mu\text{m}$ (World Precision Instruments, Inc. Sarasota, U.S.A.). La profundidad para ambos electrodos se ajustó en base a la monitorización del fEPSP. Para una adecuada conexión a tierra se utilizó un alambre de plata de 1 mm de diámetro posicionado en la corteza cerebelosa, previa trepanación de un orificio en el hueso occipital y fijado con cemento dental.

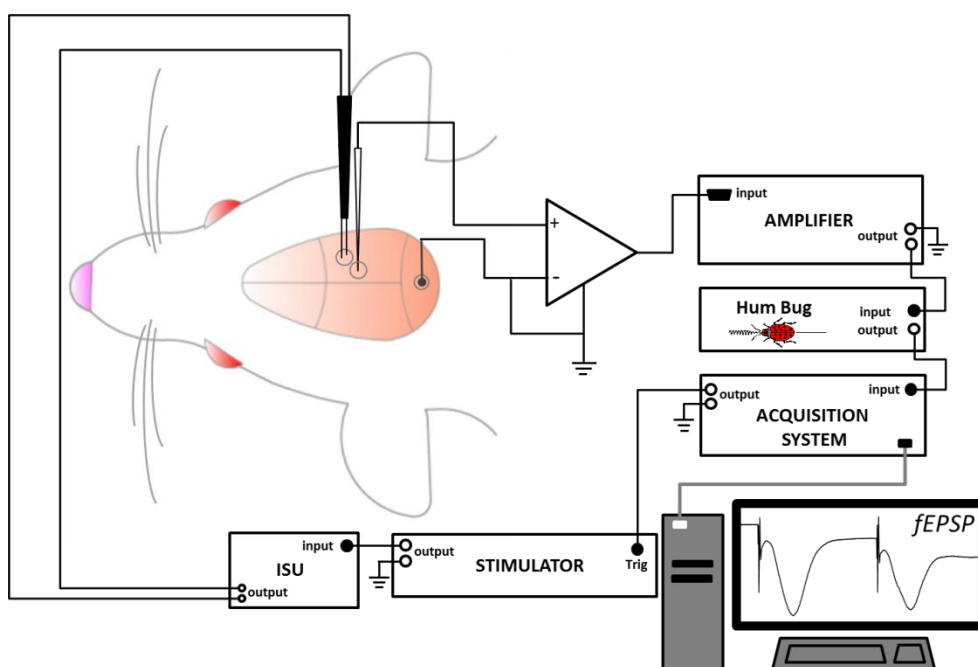


Figura 14. Diagrama de bloques del sistema de registro extracelular en animal anestesiado. Al igual que en el caso de los registros extracelulares de rodaja, la señal obtenida por el electrodo de registro (fEPSP) es amplificada y acondicionada para ser visualizada en el ordenador. Del mismo modo, el estimulador está comandado por el sistema de adquisición de datos para sincronizar el pulso de estimulación con el registro de la señal de campo.

Los potenciales sinápticos de campo se obtuvieron aplicando un pulso monofásico de 50 μ s de duración en las SCs a través de una unidad de aislamiento (SIU-C) comandada por un estimulador Grass S88X (Grass® Technologies, West Warwick, U.S.A.). Para realizar la curva de intensidad/respuesta se aplicó un pulso de estimulación a intensidades crecientes de 0 a 300 μ A con incrementos de 20 μ A cada 10 s. Cada estímulo se repitió dos veces para posteriormente obtener un valor promedio para cada incremento. En base a esta curva de intensidad/respuesta se determinó la intensidad óptima para realizar el protocolo de PPF y LTP, se utilizó aquella intensidad necesaria para obtener entre un 40-50 % del valor maximal de la pendiente del fEPSP. La señal fue amplificada (x100), filtrada (0.1 Hz-3 KHz) y digitalizada a 2 KHz. Se estudió la plasticidad a corto plazo mediante el paradigma de pares de pulsos, aplicando dos pulsos de estimulación (50 μ s de duración) a diferentes intervalos (15, 30, 50, 75, 100, 150, 300 y 500 ms) y a una frecuencia de 0.06 Hz. Se obtuvieron al menos dos valores para cada intervalo para promediarlos posteriormente. Los cambios plásticos sinápticos a largo plazo se estudiaron aplicando un protocolo de estimulación de alta frecuencia (HFS, del inglés *High-Frequency Stimulation*) que consistía en 5 trenes (200 Hz y 100 ms de duración), a intervalos de 1 s, repitiendo este paradigma 6 veces a intervalos de 1 min (Gruart et al., 2015; Figura 15). Antes de la tetanización por HFS se realizó un registro basal (0.06 Hz) hasta obtener un valor estable de la pendiente del fEPSP.

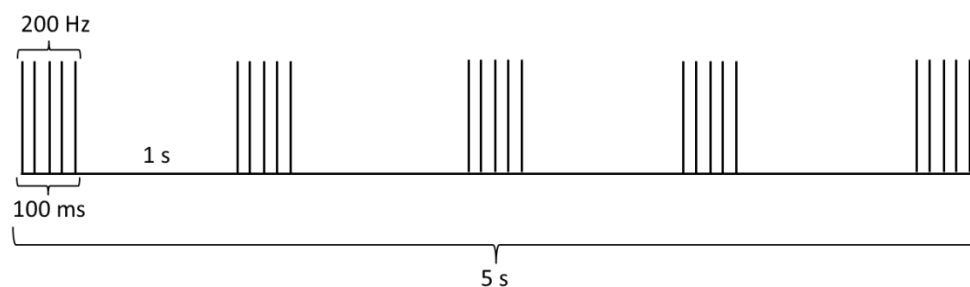


Figura 15. Representación descriptiva del protocolo de tetanización de HFS.

Ovariectomía. En algunos grupos experimentales se practicó una ovariectomía bilateral a hembras NMRI de 8 semanas de edad. Los ratones fueron anestesiados con isoflurano (1000 mg/g líquido para inhalación del vapor, IsoVet[®]) inhalado al 3.5 % en O₂ para la inducción y 1.5 % en O₂ para mantener el efecto durante la cirugía (flujo 2 L/min). Dado que los ovarios están situados en la fosa lumbar, retroperitonealmente, el abordaje quirúrgico se llevó a cabo dorsalmente por debajo del reborde costal. Tras rasurar la piel, se esterilizó con etanol 90 % y se realizó una primera incisión de aproximadamente 1.5 cm y una segunda incisión de aproximadamente un 1 cm en la capa muscular para tener acceso a la fosa lumbar. Una vez localizado el ovario se lo extrajo, disecando la grasa y el tejido conectivo circundante, crimpando la unión del ovario a la trompa con una pinza hemostática. Posteriormente, se realizó una ligadura con hilo de seda quirúrgica y se extrajo el ovario con la ayuda de un bisturí. Una vez comprobada la ausencia de hemorragias, se introdujo la trompa en la cavidad abdominal y se suturó la herida en dos capas. El mismo procedimiento se realizó del lado contralateral. El día de la cirugía a los animales se les administró, como medida analgésica, Metamizole-sodium (Novaminsulfon-ratiopharm 1, ratiopharm, Germany) a una dosis de 100 mg/Kg por vía intraperitoneal utilizando 0.9 % NaCl como vehículo (0.3 mL). A las 24 hs recibieron una segunda dosis. En aquellos casos en los que se observaron signos de dolor (pelo erizado, arqueamiento del lomo, disminución de la ingesta, etc.) se les administró Metamizole cada 24 hs hasta la desaparición de los síntomas.

Los ratones recibieron una inyección salina intraperitoneal de 0.5 mL para rehidratarlos, se les mantuvo en una jaula individual durante 7 días para su completa recuperación y una vez cicatrizadas las heridas se reagruparon en 4-5 animales por jaula.

Histerectomía. Para comprobar el éxito de la ovariectomía y la eficacia de los diferentes tratamientos hormonales, se pesaron los úteros para las distintas condiciones experimentales. Para ello, una vez obtenidas las rodajas de cerebro, se extirpó el útero del cadáver. El abordaje se realizó mediante laparotomía media. Los cuernos uterinos discurren en forma de ‘Y’ desde la zona inguinal hacia ambos hipocondrios. Una vez desplazados los intestinos para visualizar los cuernos uterinos, se divulsionó el útero del tejido conectivo que lo une al abdomen y se cortó a la altura de su unión con la vagina para extraerlo del cuerpo.

Grupos Experimentales

Grupo Control: hembras NMRI fértiles nulíparas con una edad comprendida entre 8 y 12 semanas. La vida sexual de las hembras se prolonga hasta los 13-14 meses de vida.

Grupo Machos: machos NMRI fértiles, con una edad comprendida entre 8 y 12 semanas.

Grupo Inmaduras (P15-P20): hembras NMRI con una edad entre 15 y 20 días, para registro de las corrientes sinápticas con la técnica de patch-clamp.

Grupo Inmaduras (P20-P27): hembras NMRI con una edad entre 20 y 27 días, destetadas en el día 20 o 21 del periodo de lactancia, para registro de potenciales de campo sinápticos con técnicas extracelulares.

Grupo Lactantes (L18-L21): hembras NMRI reproductoras con una edad de entre 17-20 semanas y una media de 12 crías por camada. Separada de la camada el día L18-L21 del periodo de lactancia coincidiendo con el experimento.

Grupo PRL s.c.: hembras NMRI fértiles nulíparas 8-12 semanas tratadas con una inyección subcutánea de [200 µg] de PRL, en 500 µL de solución salina (NaCl al 0.9 %), al día de 9 h a 10 h, durante 7 días continuos (Tejadilla et al., 2010).

Para los experimentos *in vivo*, aumentamos la dosis del tratamiento suministrando una inyección subcutánea de [200 µg] de PRL, en 500 µL de solución salina (NaCl al 0.9 %), cada 12 h durante 7 días continuos (Brown et al., 2014).

Grupo β -Estradiol s.c.: hembras NMRI fértiles nulíparas de 8-12 semanas tratadas con una inyección de [3 μ g] de β -Estradiol subcutáneo al día durante 7 días.

Grupo Vehículo: hembras NMRI fértiles nulíparas 8-12 semanas tratadas con una inyección subcutánea del vehículo, según la condición 500 μ L de NaCl al 0.9 % o 10 mL/Kg de aceite de sésamo, cada día de 9 h a 10 h, durante 7 días.

Grupo OVX: hembras NMRI ovariectomizadas de 7 a 8 semanas de edad y utilizadas 3 semanas después de la cirugía (11 semanas) y tratadas con vehículo según la condición experimental.

Grupo OVX + PRL s.c.: hembras NMRI ovariectomizadas con 8 semanas de edad y tratadas con una inyección subcutánea de [200 μ g] de PRL, en 500 μ L de solución salina (NaCl al 0.9 %), al día de 9 h a 10 h, al día durante 7 días continuos.

Grupo OVX + β -Estradiol s.c.: hembras NMRI ovariectomizadas con 8 semanas de edad. Se realizaron dos tratamientos de β -Estradiol:

- Agudo: se administró una inyección s.c. de [3 μ g/Kg] en un volumen de aceite de sésamo de 10 mL/Kg y el animal fue decapitado a los 40 min para la extracción de las rodajas (Phan et al., 2012).
- Crónico: se trataron animales con una inyección s.c. diaria de 9 h a 10 h de [3 μ g/Kg] durante 7 días continuos.

Los experimentos se realizaron 3 semanas después de la cirugía y los tratamientos se iniciaron 2 semanas después de la ovariectomía.

Inicialmente se prepararon soluciones stock para cada fármaco siguiendo las instrucciones de la hoja de especificaciones facilitada por el fabricante; por lo que fueron diluidas en su mayoría en DMSO (< 0.02 %) o en H₂O mQ, salvo que se especifique lo contrario.

D-AP5 [50 µM]. D-(-)-2-Amino-5-phosphonopentanoic acid. Antagonista de receptores de glutamato tipo NMDA. TOCRIS.

CNQX [20 µM]. 6-Cyano-7-nitroquinoxaline-2,3-dione disodium. Antagonista de receptores de glutamato tipo AMPA. TOCRIS.

(-)-Bicuculline methochloride [50 µM]. [R-(R*,S*)]-5-(6,8-Dihydro-8-oxofuro [3,4-e]-1, 3-benzodioxol-6-yl)-5, 6, 7,8-tetrahydro-6, 6-dimethyl-1, 3-dioxolo [4,5-g] isoquinolinium chloride. Antagonista de receptores GABA tipo A. TOCRIS.

Picrotoxin [100 µM]. Antagonista de receptores GABA tipo A. SIGMA.

QX 314 [2 mM]. N-(2,6-Dimethylphenylcarbamoylmethyl) triethylammonium bromide. Bloquea canales de sodio. TOCRIS.

SCH 23390 [5 µM]. (R)- (+)-7-Chloro-8-hydroxy-3-methyl-1-phenyl-2, 3, 4, 5-tetrahydro-1H-3-benzazepine hydrochloride. Antagonista de los receptores de dopamina tipo D₁ y D₅. TOCRIS.

(S)-(-)-Sulpiride [1 µM]. Antagonista del receptor de dopamina D₂. SIGMA.

Cabergoline [0.5 mg/Kg]. Agonista del receptor de dopamina D₂. SIGMA.

AG 490 [10 µM]. (E)-2-Cyano-3-(3,4-dihydrophenyl)-N-(phenylmethyl)-2-propenamide. Inhibidor de JAK2. TOCRIS.

Prolactina de oveja. PRL incubada [200nM]. SIGMA. Para los registros extracelulares *in vitro* (fEPSP) las rodajas fueron incubadas con PRL

durante 20 minutos antes de ser transferidas a la cámara de registro. La PRL se mantuvo en el baño durante todo el experimento. En el caso de los experimentos de patch-clamp la PRL se perfundió en el baño durante 20 minutos una vez estabilizado el registro de la corriente a estudiar.

β- Estradiol [3 µg/Kg]. Agonista del receptor de estrógeno endógeno. SIGMA. Se preparó una solución inicial en DMSO y se diluyó posteriormente en aceite de sésamo para la administración subcutánea, permitiendo una absorción gradual del fármaco.

Análisis de los datos

Para valorar los cambios en la transmisión sináptica basal se fijó una ventana temporal (0.8-1 ms) donde la función de la pendiente del fEPSP presentaba un valor lineal y se representó en valores absolutos. Igualmente se procedió para estudiar la potenciación a largo plazo en las diferentes condiciones experimentales. En este caso, los valores de la pendiente de los fEPSP fueron normalizados para el curso temporal, considerando como el 100 % el valor promedio de los últimos 10 min antes de aplicar el protocolo de estimulación, y calculando el valor porcentual para cada trazo. Este análisis se realizó con el software Scope. Para obtener el ratio de la PPF, se fijaron dos ventanas de la misma duración y con el mismo criterio para la identificación de la pendiente óptima. Se denominó R1 a la primera respuesta y R2 a la segunda respuesta y se aplicó la siguiente fórmula $(R2-R1)/R1$. Estas medidas se llevaron a cabo con el software Clampfit 10.2.

Para estudiar los cambios en las PSC se midieron los valores pico de las amplitudes de las corrientes y se normalizaron tomando como el 100 % el promedio de los valores basales previos a la perfusión de PRL.

Para observar si existían diferencias en el ratio de las corrientes NMDA/AMPA en condiciones de voltaje-dependencia ($V_H = -60$ mV y $V_H = +60$ mV) se ajustó la línea basal del registro a 0 mV y se fijó una ventana temporal con inicio inmediatamente después del artefacto y una duración de 10 ms para medir la amplitud de la respuesta AMPA. Para medir la corriente NMDA se fijó una ventana de 75 ms a 85 ms para determinar el valor promedio de la amplitud.

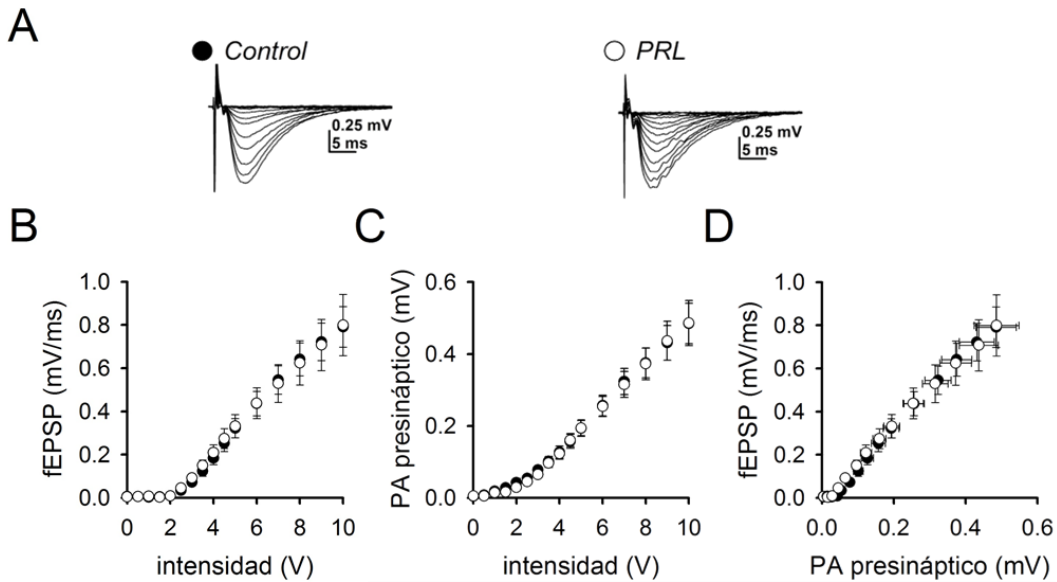
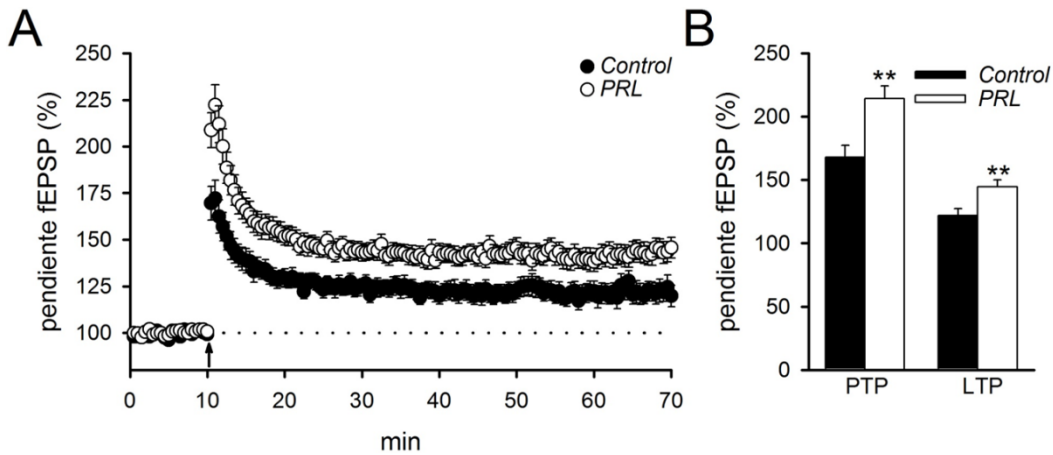
Para el análisis de la excitabilidad de las neuronas se contaron el número de PA para cada pulso en las diferentes series. Para obtener la frecuencia de disparo de las neuronas se dividió el número de PA entre la duración del pulso (0.5 s) y se obtuvo un valor promedio para el mismo pulso.

Para determinar el éxito de las ovariectomías y los distintos tratamientos empleados se utilizó el peso del útero como indicador. Para corregir la variabilidad entre animales para el mismo rango de edad se normalizó el valor del peso del útero estableciendo un ratio entre el peso corporal y el peso del útero ($(g_{\text{animal}}/g_{\text{útero}})*100$).

El análisis estadístico se realizó usando la prueba t Student para dos muestras suponiendo varianzas desiguales utilizando Microsoft Excel. Los valores se consideraron estadísticamente significativos cuando $p < 0.05^*$, $p < 0.01^{**}$ y $p < 0.001^{***}$. Los datos se representaron como la media \pm error estándar y los gráficos se construyeron con el programa SigmaPlot 2000.

RESULTADOS

La conducta observada en los mamíferos durante la maternidad y la lactancia, implica cambios importantes en la estructura y la plasticidad del SN. Si bien se ha demostrado el papel de distintas hormonas en estas modificaciones, no se conoce si la PRL, una hormona crucial en el periodo de lactancia y cuyo principal órgano diana es la glándula mamaria, puede modificar la plasticidad del SN. Para contestar esta pregunta hemos estudiado si la PRL afecta a la plasticidad sináptica a corto y largo plazo en la conexión CA3-CA1. Como primera aproximación investigamos con técnicas extracelulares, si la PRL aplicada exógenamente en rodajas de cerebro de ratones, hembras fértiles nulíparas, provoca cambios en la plasticidad sináptica. La presencia de PRL (200 nM, $\approx 4.5 \mu\text{g/mL}$) (Lyons et al., 2012) produce un aumento significativo tanto en la PTP (Figura 16A, B; Control: $168.05 \% \pm 9.17$, $n=20$; PRL: $214.32 \% \pm 9.82$, $n=15$; $**p < 0.01$) como en la LTP (Figura 16A, B; Control: $121.92 \% \pm 5.56$, $n=20$; PRL: $144.69 \% \pm 5.36$, $n=15$; $**p < 0.01$) en esta región del hipocampo. En estas condiciones experimentales no se observaron cambios en la pendiente de los fEPSP (Figura 17A, B) ni en la amplitud de los PA pre-sinápticos para distintos valores de intensidad (Figura 17C), lo que se tradujo en una curva de estímulo/respuesta sin diferencias significativas (Figura 17D). Estos datos indican que la PRL es capaz de modificar la plasticidad sináptica a corto y largo plazo en el hipocampo sin producir cambios en la transmisión sináptica basal ni en la excitabilidad del circuito.



Puesto que los niveles de PRL en sangre varían dependiendo de las condiciones fisiológicas (ciclo estral, hembras amamantando, condiciones de estrés, etc.) y patológicas (i.e., adenoma hipofisiario), estudiamos si el incremento de la potenciación sináptica en presencia de PRL exógena varía en función de su concentración, empleando valores de 20 nM (≈ 450 ng/mL; Brown et al., 2012) y 400 nM (≈ 9 μ g/mL; Lyons et al., 2012). Se observaron valores de potenciación significativos en la PTP (Figura 18; $215.01 \% \pm 9.88$; $n = 11$; $**p < 0.01$) y LTP (Figura 18; $144.58 \% \pm 5.2$, $n = 11$; $**p < 0.01$) en presencia de 400 nM de PRL exógena en el baño pero no con dosis menores de hasta 20 nM (Figura 18, PTP: $181.34 \% \pm 9.51$; LTP: $122.92 \% \pm 4.03$, $n = 6$). Por lo tanto, podemos concluir que los cambios en la plasticidad sináptica inducidos por la PRL son dosis dependientes, llegando a un nivel de saturación con concentraciones por encima de 200 nM.

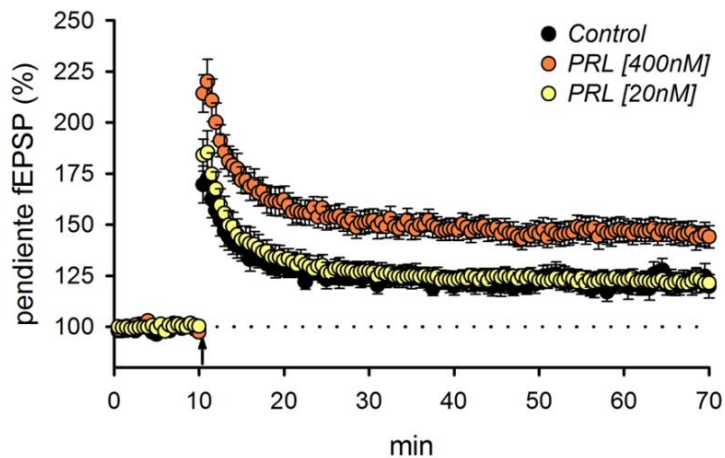


Figura 18. El efecto de la PRL exógena sobre la LTP es dosis dependiente. No se observa una potenciación de los fEPSP en presencia de 20 nM PRL (●, $n = 6$) pero si existe un aumento significativo en la PTP (●, $n = 11$; $**p < 0.01$) y en la LTP para 400 nM PRL (●, $n = 11$; $**p < 0.01$) respecto a los valores control (●, $n = 15$).

El hecho de observar que la PRL aplicada exógenamente modifica la plasticidad sináptica de la región de CA1 en el hipocampo en hembras fértiles nulíparas nos llevó a estudiar si este efecto existe en condiciones fisiológicas de inmadurez sexual. Nuestros resultados muestran que no hay diferencias significativas en la PTP y LTP en presencia de PRL exógena en animales no desarrollados sexualmente con una edad comprendida entre 20 y 30 días (Figura 19A; $n=7$ en ausencia y $n=8$ en presencia de PRL). Por otra parte, quisimos establecer si este efecto dependía del género o se trataba de un fenómeno generalizado y dependiente del desarrollo sexual. No se observaron cambios en la plasticidad sináptica en machos adultos con una edad comprendida entre 8 y 10 semanas al aplicar PRL exógena (Figura 19B; $n=9$ en ausencia y $n=11$ en presencia de PRL). Estos resultados en su conjunto indican que los cambios tanto en la PTP como en la LTP inducidos por la PRL requieren de la madurez sexual del SN y, además, depende del género.

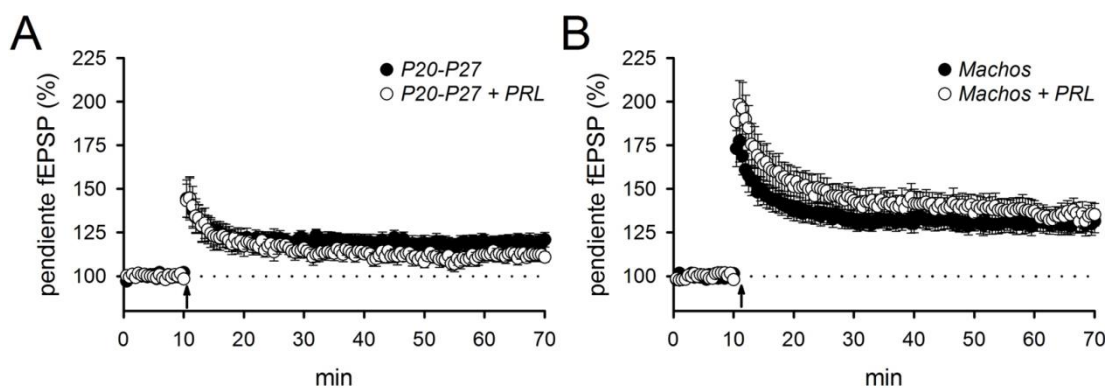


Figura 19. La regulación de la plasticidad sináptica por la PRL es exclusiva de hembras y dependiente de su desarrollo sexual. No existen diferencias en la PTP o la LTP en hembras sexualmente inmaduras (●, $n=7$; ○, $n=8$) (A) o en machos adultos (●, $n=9$; ○, $n=11$) (B).

La PRL pasa desde la sangre al líquido cefalorraquídeo través de los plexos coroides por un mecanismo mediado por transportador, o, también, a través de los capilares fenestrados de la eminencia media (Grattan, 2002). Por lo tanto, las acciones de esta hormona en el SN pueden ser debidas a la PRL de origen hipofisario o extra-hipofisario. Teniendo en cuenta estos datos previos y los presentes resultados, que muestran cambios en la plasticidad sináptica por la acción directa de la PRL sobre el hipocampo, nuestro siguiente objetivo fue estudiar si distintos niveles de PRL en sangre modifican la LTP empleando diferentes aproximaciones experimentales. Dado que se conoce que la maternidad mejora el aprendizaje y la memoria en relación a un aumento del número de espinas dendríticas en el hipocampo (Kinsley et al, 2006), en primer lugar estudiamos la potenciación sináptica en la región de CA1 en hembras reproductoras durante la lactancia. Estas hembras fueron separadas de la camada entre el día 18 y 21 (L18, L21) del periodo de lactancia, donde se conoce que los niveles de PRL en sangre medidos con radioinmunoanálisis son altos (363 ± 59 ng/mL; Brown et al, 2011) frente a hembras fértiles nulíparas en diestro (54.3 ± 8.6 ng/mL; Brown et al, 2010). Los resultados muestran una tendencia a un incremento de la LTP en hembras en periodo de lactancia ($n= 13$) respecto a las hembras controles ($n= 15$), pero las diferencias en la PTP (Figura 20A, B; L18-L21: $186.79 \% \pm 11.34$, $n=13$) y LTP (Figura 20A, B; L18-L21: $129.44 \% \pm 4.48$, $n=13$) no son significativas. Tampoco se observaron diferencias estadísticamente significativas con respecto a los valores obtenidos en hembras en las que se perfundió PRL exógena (Figura 20A, B). Es posible que esto pueda ser debido al día de lactación en el que realizamos el experimento ya que conocemos que la concentración de PRL incrementan gradualmente durante la lactancia hasta aproximadamente la mitad de este periodo (L12, L14) y a partir de este pico se produce una caída más drástica (Brusco et al., 2008; Guillou et al., 2015).

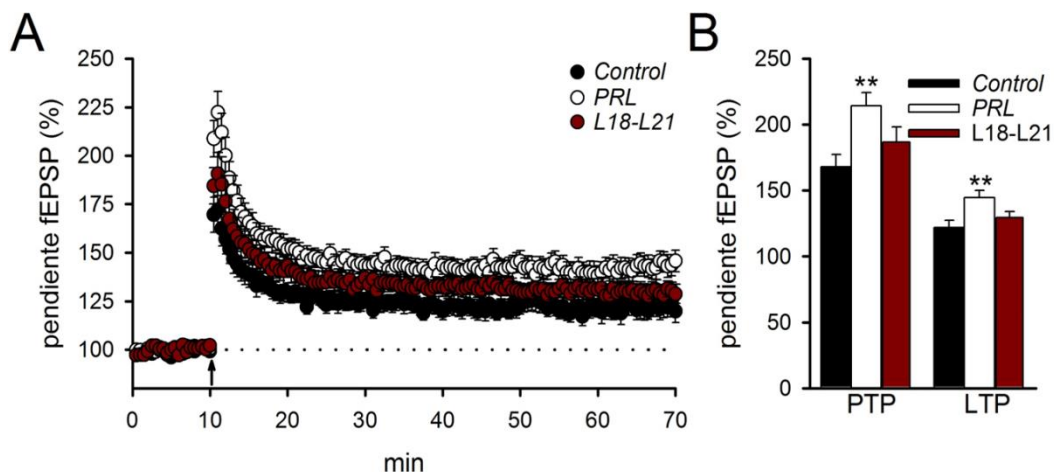


Figura 20. Las hembras en periodo de lactancia (L18-L21) no presentan cambios en la plasticidad sináptica respecto a hembras fértiles nulíparas. A, B, los valores de potenciación en hembras en periodo de lactancia (●, n= 13) muestran una tendencia por encima de los valores controles pero no son significativos. Tampoco se observaron diferencias con respecto a las hembras fértiles nulíparas en las que se perfundi6 PRL ex6gena 200 nM (datos obtenidos de la Figura 16).

Como segunda aproximaci6n, se estandariz6 un modelo de hiperprolactinemia que consistía en una inyecci6n subcutánea diaria de 200 µg de PRL durante 7 días (ver Materiales y Métodos). En estas condiciones experimentales, no se observaron cambios significativos en los valores de PTP y LTP con respecto a los controles tratados con vehículo (Figura 21; vehículo, n= 10; PRL s.c., n= 16). A pesar de realizar la administraci6n de forma subcutánea para ralentizar la absorci6n de PRL, es posible que el eje hipotálamo-hip6fisario sea capaz de regular este aumento pulsátil de PRL; por lo cual, no se alcancen concentraciones suficientes de PRL en el líquido cefalorraquídeo como para producir cambios en la plasticidad sináptica del hipocampo.

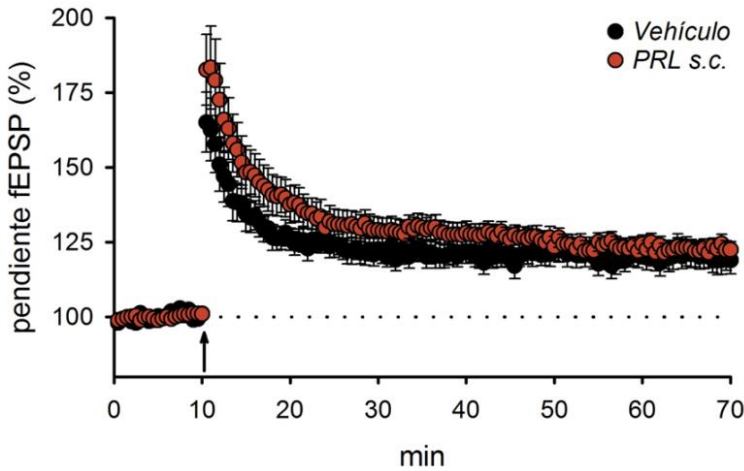


Figura 21. La PRL periférica no modifica la plasticidad sináptica en el hipocampo *in vitro*. No se observan diferencias en la LTP entre animales control (●, n= 10) y animales tratados con PRL subcutánea [200 µg] durante 7 días (●, n= 16).

Para descartar que esta falta de efecto de la PRL no fuese debida a las condiciones del estudio *in vitro*, se llevaron a cabo experimentos en animales anestesiados (ver Materiales y Métodos) incrementando, además, la dosis de PRL a 200 µg inyectados subcutáneamente cada 12 h (Brown et al., 2014) (ver Materiales y Métodos). La aplicación de un tren de HFS induce niveles similares de PTP y LTP en ambas condiciones experimentales, no observándose, además, cambios en la transmisión sináptica basal (Figura 22A y B respectivamente; vehículo, n= 5; PRL s.c., n= 4).

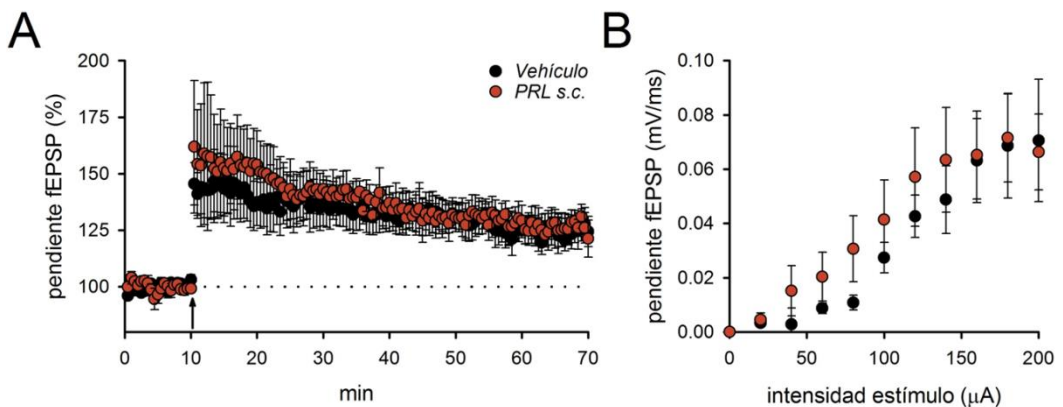


Figura 22. El tratamiento con PRL s.c. no modifica la plasticidad sináptica en el hipocampo en animales anestesiados. A, curso temporal de la LTP en animales tratados con vehículo (●, n= 5) y con PRL subcutánea [400 µg] cada 12 h durante 7 días (●, n= 4). B, valores de la pendiente de los fEPSP para diferentes intervalos de intensidad.

Como tercera aproximación, utilizamos un modelo de hipoprolactinemia aguda inducida farmacológicamente mediante la administración de una inyección intraperitoneal de cabergolina (CB [0.5 mg/Kg]; i.p.), un agonista del receptor D₂, a hembras fértiles de 8-10 semanas, que fueron decapitadas 2 horas después para la extracción de las rodajas (Ratner et al., 2012; Recouvreux et al., 2011). La cabergolina actúa en receptores dopaminérgicos de células del hipotálamo para suprimir la producción de PRL en la glándula pituitaria (Radl et al., 2008). Este modelo de hipoprolactinemia no afecta a la plasticidad sináptica ya que no existen diferencias respecto a los valores de potenciación sináptica de los animales controles (Figura 23; CB i.p., n= 9).

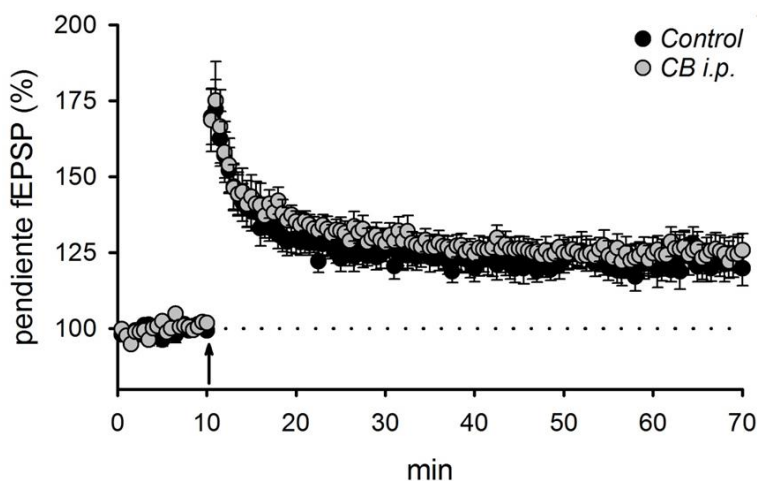


Figura 23. La disminución de PRL periférica no afecta a la plasticidad sináptica en hembras fértiles nulíparas. El tratamiento con cabergolina intraperitoneal (CB i.p., ●, n= 9), un agonista del receptor D₂, no modifica la LTP en el hipocampo con respecto a los animales control (●, n= 15).

Analizados todos estos datos en su conjunto, podemos concluir que sólo la aplicación exógena de PRL, por encima de valores de 200 nM, produce cambios plásticos sinápticos en el hipocampo, no observándose modificaciones en

condiciones experimentales de hiperprolactinemia fisiológica o provocada (Figura 24).

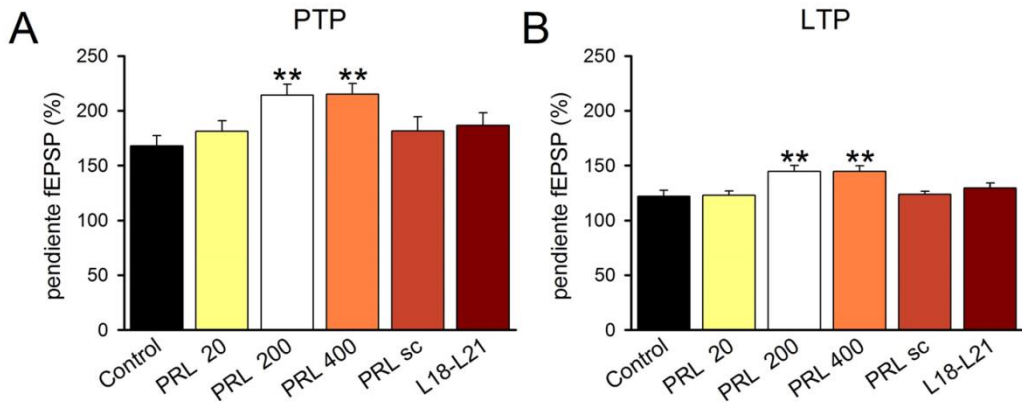


Figura 24. Gráficos de barras comparativos para las diferentes condiciones experimentales. **A**, valores medios de la PTP inmediatamente después de la aplicación del TBS. **B**, valores medios de la LTP a los 60 min de la aplicación del TBS. Datos obtenidos de las figuras 16, 17, 20 y 21.

Teniendo en cuenta el componente excitador e inhibitor presente en la sinapsis en estudio, es lógico presuponer que el incremento de la LTP observada en presencia de PRL exógena pueda ser debido a un aumento de la actividad excitadora, una disminución de la actividad inhibitora o una modificación del balance excitador-inhibidor sobre la sinapsis de CA3-CA1. Por otra parte, el receptor GABA_A es un importante mediador de la neurotransmisión GABAérgica en el SNC y se conoce que existen niveles altos de progesterona en el cerebro materno durante la gestación asociados con alteraciones en la expresión del receptor GABA_A en el hipocampo (Sanna et al., 2009). Por lo tanto, nos propusimos determinar el papel de la transmisión sináptica inhibitora mediada por receptores GABA_A en la regulación de la LTP mediada por la PRL exógena. El bloqueo de la inhibición en presencia de picrotoxina (PTX [100μM]), un antagonista específico de receptores tipo GABA_A, contrarresta el aumento de la

LTP en presencia de PRL exógena en hembras fértiles nulíparas (Figura 25; PTX: $160.32 \% \pm 11.93$, $n = 6$; PTX + PRL: $133.42 \% \pm 4.08$, $n = 9$) alcanzando valores a los 60 minutos que están, incluso, por debajo de los valores en ausencia de PRL, sin llegar a ser significativos. Estos datos nos indican que la PRL modifica la actividad inhibitoria mediada por receptores tipo $GABA_A$, contribuyendo este mecanismo al aumento de la eficacia sináptica observada en presencia de PRL.

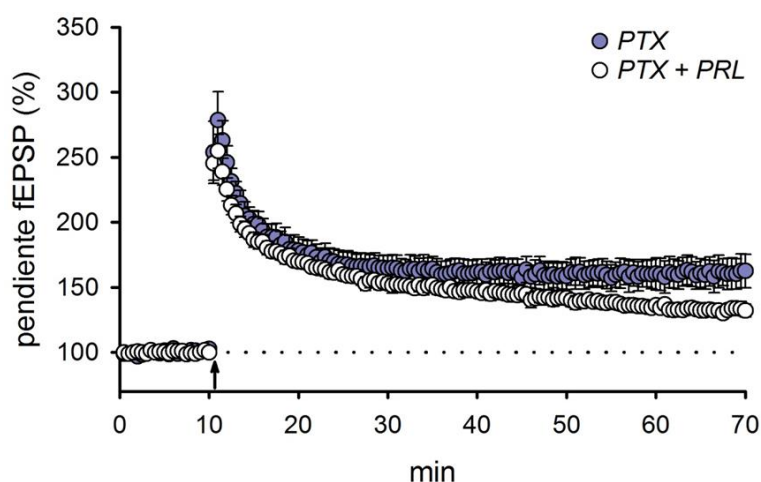


Figura 25. La PRL exógena modifica la LTP a través de la inhibición mediada por los receptores tipo $GABA_A$. Curso temporal de la pendiente de los fEPSP en presencia de picrotoxina (PTX 100 μ M; ●, $n = 6$) y PTX más 200 nM PRL (○, $n = 9$). Se observa una oclusión del efecto de la PRL en la LTP con valores que tienden a ser menores que los observados en ausencia de PRL sin ser significativamente diferentes.

La dopamina (DA) es el mayor inhibidor de síntesis y secreción de PRL en el eje hipotálamo-hipofisiario (neuronas TIDA). El reflejo neuroendocrino de succión del pezón disminuye la DA lo que produce un aumento de PRL que estimula la lactancia. Además, se conoce que receptores de dopamina tipo D_1 y D_2 regulan la LTP en diferentes zonas del cerebro como el estriado, la amígdala y el hipocampo (Granado et al, 2008; Li et al., 2014; Hernandez et al., 2016). Por ello, hemos estudiado si estos receptores intervienen en los cambios plásticos

observados en presencia de PRL exógena en el hipocampo. En primer lugar investigamos el receptor tipo D₁ por su conocida participación en la LTP del hipocampo (Granado et al, 2008; Swant et al., 2010; Zhu et al., 2012; Puighermanal et al., 2016). Aplicando el antagonista específico del receptor D₁ SCH 23390 [5 μ M] en el baño (Figura 26A; n = 6), examinamos si existían diferencias en la LTP en presencia de PRL [200 nM] (Figura 26A; n = 7). En estas condiciones no se observa el aumento de la PTP (Figura 26A, B; SCH: 168.99 % \pm 16.7, n= 6; SCH + PRL: 169.11 % \pm 12.73, n= 7) y LTP (Figura 26A, B; SCH: 122.98 % \pm 6.84, n= 6; SCH + PRL: 124.39 % \pm 7.59, n= 7) que produce la PRL exógena, obteniéndose valores de potenciación similares a la condición control en ausencia de PRL (Figura 16B).

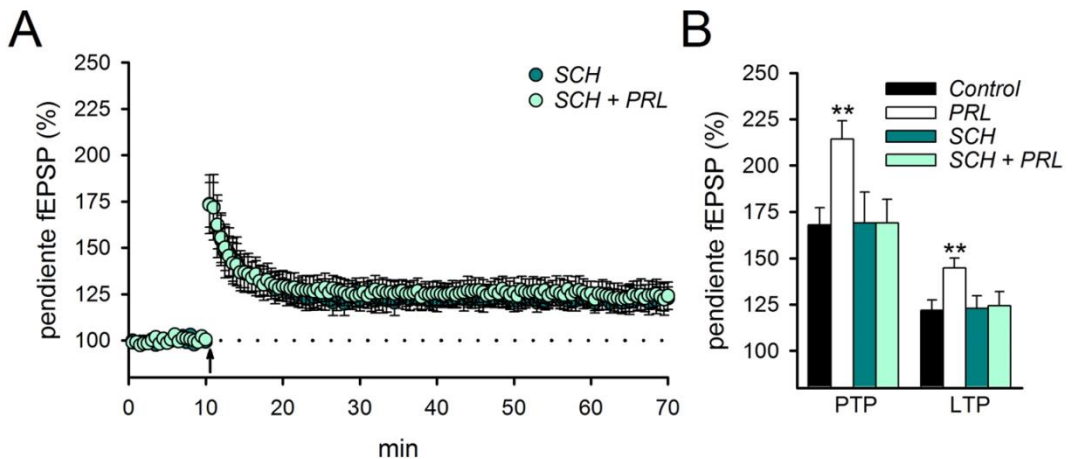


Figura 26. El receptor de dopamina D₁ participa en la regulación de la LTP mediado por PRL exógena en la región CA1. A, no se observan diferencias en los valores de potenciación sináptica en presencia de SCH 23390 [5 μ M] (●, n= 6) y SCH 23390 más PRL [200 nM] (○, n= 7) en el baño. B, los valores de PTP y LTP al bloquear el receptor D₁ son similares a los obtenidos en las condiciones control (■, n=20; □, n=15; datos tomados de la Figura 16).

Por otra parte, se observaron diferencias significativas en la transmisión sináptica basal (Figura 27A; SCH: 0.68 \pm 0.061; n= 6; SCH + PRL: 0.933 \pm 0.084;

$n=7$; $*p<0.05$) y la amplitud de los PA pre-sinápticos (Figura 27B; SCH: 0.365 ± 0.033 , $n=6$; SCH + PRL: 0.487 ± 0.033 , $n=7$; $*p<0.05$) en ambas condiciones experimentales sin que se correlacionen con cambios en la curva de estímulo-respuesta (Figura 27C), lo que indica un posible cambio en la excitabilidad axonal.

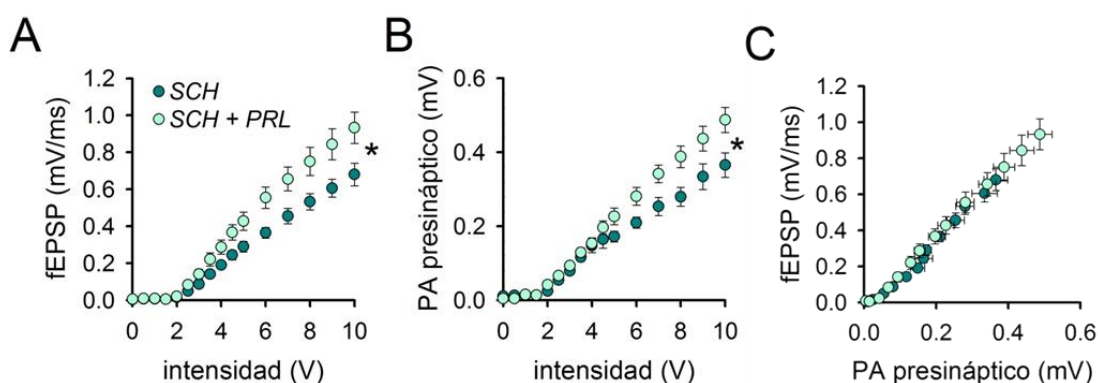


Figura 27. La PRL exógena modifica la transmisión sináptica basal al antagonizar el receptor D_1 . Se observan diferencias significativas en la pendiente de los fEPSP (A; $*p<0.05$) y en la amplitud de los PA pre-sinápticos (B; $*p<0.05$) al perfundir PRL en presencia del antagonista SCH 23390 sin modificarse la relación estímulo-respuesta sináptica (C).

La DA activa receptores D_2 en las células lactótrafas de la hipófisis anterior para inhibir tónicamente la secreción de PRL (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001). Del mismo modo, el bloqueo del receptor de dopamina tipo D_2 con el antagonista específico sulpiride (SPD [$1 \mu M$]; Zhu et al, 2012), también ocluye el efecto que provoca la PRL exógena tanto en la PTP (Figura 28A, B; SPD: $187.33 \% \pm 15.50$, $n=7$; SPD + PRL: $197.65 \% \pm 15.45$, $n=7$) como en la LTP (Figura 28A, B; SPD: $130.67 \% \pm 2.69$, $n=7$; SPD + PRL: $128.99 \% \pm 8.15$, $n=7$) de manera similar a lo que ocurre con el antagonismo del receptor D_1 .

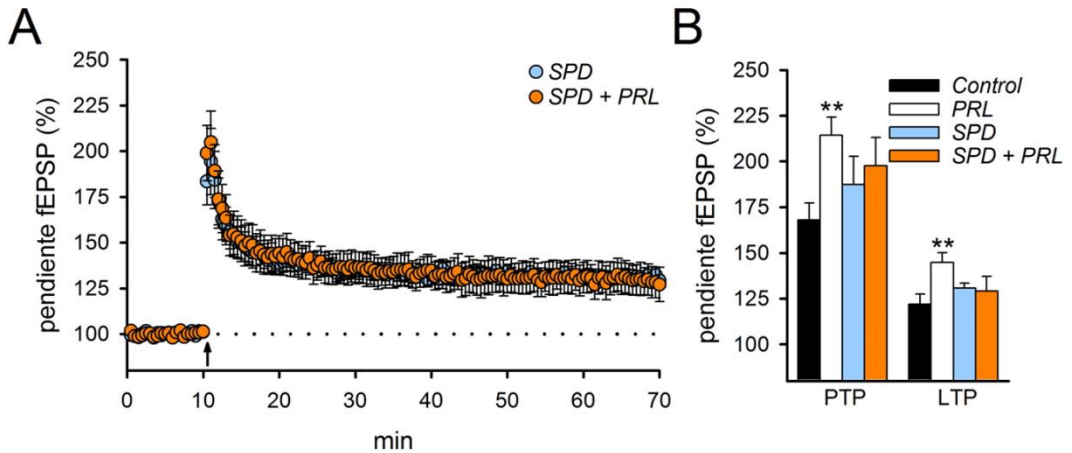


Figura 28. El receptor de dopamina D_2 bloquea el aumento de LTP mediado por PRL exógena en la región CA1. **A**, no se observan diferencias en los valores de potenciación sináptica al aplicar PRL [200 nM] en presencia de sulpiride (SPD) [1 μ M] en el baño (●, $n=7$, ○, $n=7$). **B**, los valores de PTP y LTP al antagonizar el receptor D_2 son similares a los obtenidos en las condiciones control (■, $n=20$; □, $n=15$; datos tomados de la Figura 16).

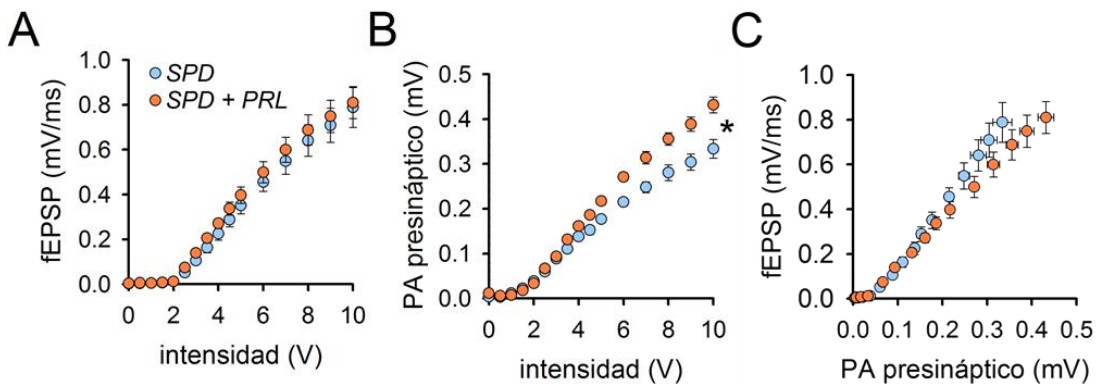


Figura 29. La PRL exógena modifica la excitabilidad axonal cuando se bloquea el receptor D_2 . **A**, No se observan diferencias en la pendiente de los fEPSP en presencia de PRL pero si aumenta la amplitud de los PA pre-sinápticos (**B**; * $p < 0.05$) (**B**). Sin modificarse significativamente la relación entrada-salida sináptica (**D**).

No obstante, al estudiar la transmisión sináptica basal sólo se observaron cambios significativos en la amplitud de los PA (Figura 29B; SPD: 0.3339 ± 0.0209 , $n=7$; SPD + PRL: 0.4315 ± 0.0178 , $n=7$; $*p < 0.05$) manteniéndose valores similares en la pendiente de los fEPSP (Figura 29A; SPD: 0.7884 ± 0.0892 , $n=7$; SPD + PRL: 0.81 ± 0.0718 , $n=7$; $*p < 0.05$) y en la curva estímulo-respuesta sináptica (Figura 29C) al igual que ocurre con el antagonismo de los receptores D₁.

Analizados en su conjunto, estos datos indican que existe una importante contribución de los receptores dopaminérgicos tipo D₁ y D₂ al mecanismo de regulación por el que la PRL modifica la eficacia sináptica en el hipocampo. Por otra parte, la PRL es capaz de modificar la transmisión sináptica basal y la excitabilidad axonal al disminuir la actividad de los receptores dopaminérgicos.

El receptor de PRL es miembro de la familia de receptores de citoquinas tipo I y, por lo tanto, activa diferentes vías de señalización intracelulares. La señalización JAK/STAT es la mejor caracterizada de estas vías y puesto que se conoce que su inhibición bloquea la inducción de LTD a través del receptor NMDA en el hipocampo (Nicolas et al., 2012) y la disminución de la memoria (Chiba et al., 2009), se comprobó si esta vía participa en el aumento de LTP en presencia de PRL. La inhibición de la vía de señalización JAK/STAT en el hipocampo con el antagonista específico AG 490 [10 μ M] (Figura 30; PTP: $162.27 \% \pm 21.85$, LTP: $129.45 \% \pm 5.13$, $n=7$), bloquea el incremento de la potenciación sináptica producido por la PRL (Figura 30; PTP: $164.26 \% \pm 14.43$, LTP: $114.28 \% \pm 7.76$, $n=9$). Por lo tanto, los cambios plásticos sinápticos inducidos por la PRL implican la fosforilación de JAK2 y la activación de su respectiva cascada de señalización.

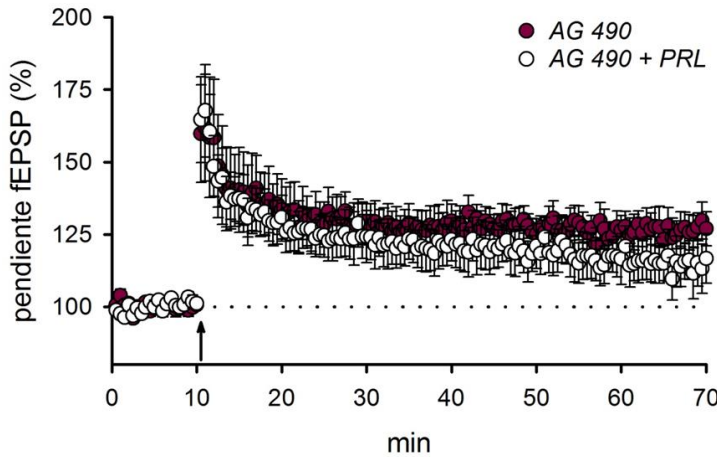


Figura 30. El bloqueo de la vía de señalización JAK/STAT ocluye el aumento de la LTP en presencia de PRL exógena en la región CA1. Al inhibir la vía JAK/STAT con AG 490 [10 μ M] no se observan diferencias en los valores de PTP o LTP en presencia de PRL [200 nM] (●, n= 7; ○, n= 9).

Para determinar el origen pre o post-sináptico de los fenómenos observados, utilizamos el paradigma de la facilitación por pares de pulsos (ver Materiales y Métodos). Nuestros resultados indican que en el aumento de potenciación en la LTP mediado por la PRL participan mecanismos pre-sinápticos, ya que se observaron diferencias significativas para un intervalo de 30 ms en presencia de PRL (Figura 31; Control: 0.6803 ± 0.0498 , n = 27; PRL: 0.8258 ± 0.0353 , n= 30; $*p < 0.05$). Esto nos indica que la PRL está modificando la probabilidad de liberación de neurotransmisor para un intervalo específico de tiempo.

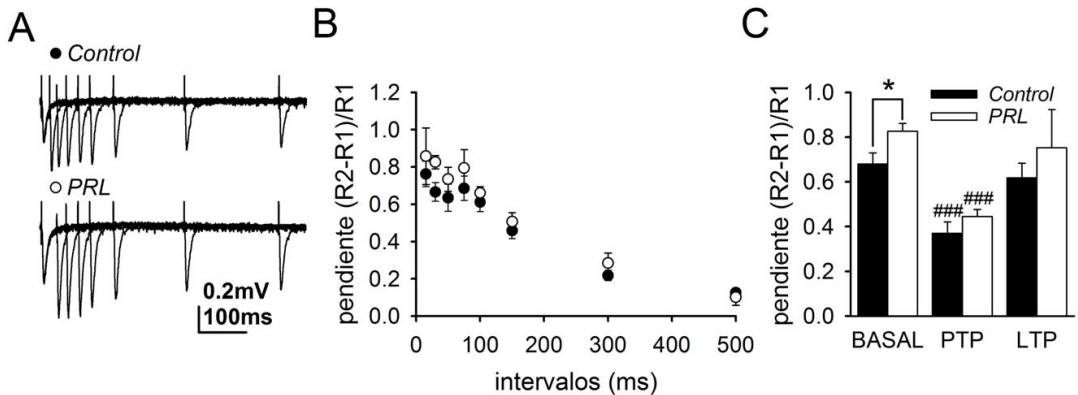


Figura 31. La PRL modifica la probabilidad de liberación de neurotransmisor. A, registros de los fEPSP representativos en condiciones control y con PRL para diferentes intervalos de estimulación. B y C, observamos una tendencia en el aumento de la PPF en rodajas incubadas con PRL (○, n= 30) para los intervalos menores siendo significativo para un intervalo de 30 ms ($*p < 0.05$) con respecto a los valores control.

Para conocer los tipos de receptores involucrados en los cambios plásticos mediados por la PRL, utilizamos la técnica de patch-clamp (ver Materiales y Métodos) para determinar el grado de participación de las corrientes sinápticas excitadoras e inhibitoras de las neuronas CA1, provocadas por la estimulación de las SCs, en presencia de PRL. En primer lugar, estudiamos la corriente post-sináptica (PSC) con todos sus componentes glutamatérgicos y GABAérgicos en hembras de 8-10 semanas. Tras un registro basal de 5 a 10 minutos, se perfundió la rodaja con PRL a una concentración de 200 nM durante 20 minutos. Se utilizó un protocolo para determinar la PPF previo a la perfusión con PRL y al finalizar la misma. La presencia de PRL [200 nM] en el baño produjo un aumento significativo de la PSC (Figura 32A, B; $117.75 \% \pm 5.74$, $n = 7$; $*p < 0.05$).

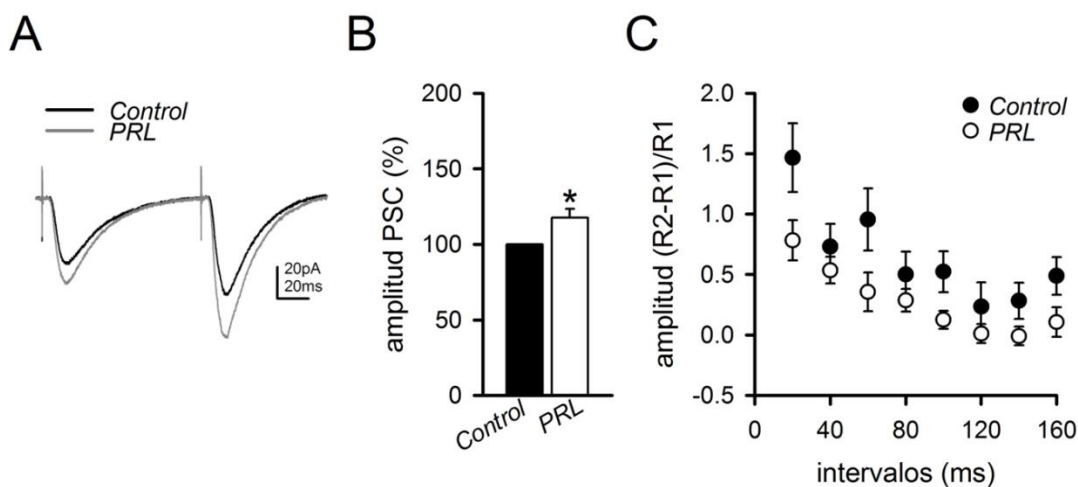


Figura 32. La PRL exógena incrementa la amplitud de las PSC en hembras fértiles nulíparas. **A**, registros representativos de las PSC en la región CA1 del hipocampo en condiciones control y en presencia de PRL. **B**, la aplicación de PRL [200 nM] en el baño produce un aumento significativo ($n = 7$, $*p < 0.05$) de las PSC en neuronas de la región de CA1. **C**, no se observan cambios significativos en la PPF aunque existe una tendencia a intervalos cortos en presencia de PRL.

Este fenómeno de potenciación de las PSC también se observó en animales inmaduros de 14 a 20 días (Figura 33A; $135.98 \% \pm 9.17$, $n= 8$; $**p< 0.01$), indicando la presencia de receptores funcionales en estadios tempranos del desarrollo. La PPF no se modificó por la presencia de PRL en estos animales a distintos intervalos de estimulación (Figura 33B, C).

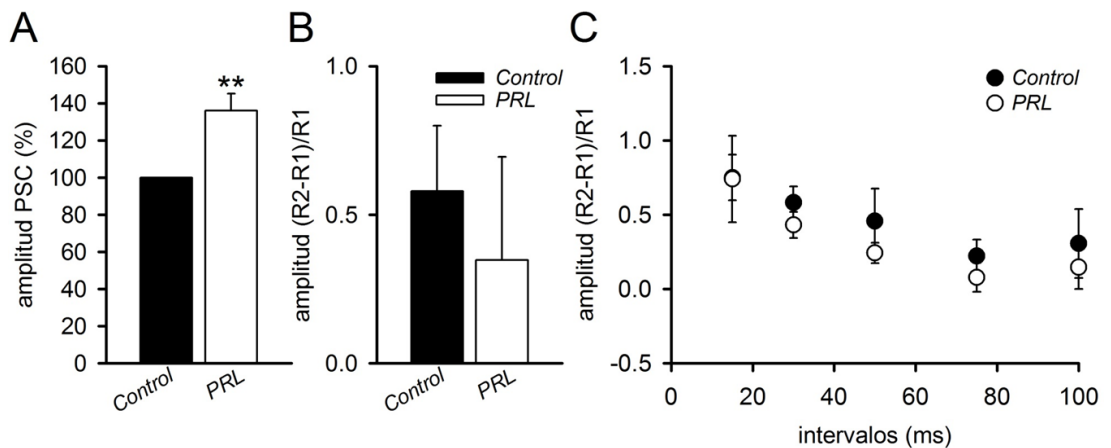


Figura 33. La PRL exógena produce un aumento de la PSC en hembras inmaduras. **A**, la aplicación de PRL [200 nM] en el baño produce un aumento significativo ($n= 8$, $** p< 0.01$) de las PSC en neuronas de la región de CA1. **B** y **C**, no se observan cambios significativos en la plasticidad a corto plazo en presencia de PRL.

Para determinar las corrientes involucradas en este aumento de la PSC inducido por PRL, aislamos, farmacológicamente, cada una de ellas aplicando los diferentes antagonistas en el baño (ver Materiales y Métodos). Dado que nuestros datos previos indican que la PRL puede regular la plasticidad sináptica a corto y largo plazo modificando la actividad inhibitora, estudiamos, en primer lugar, las corrientes inhibitoras post-sinápticas (IPSC) aplicando en el baño CNQX [20 μ M] y D-APV [50 μ M], antagonistas de los receptores glutamatérgicos tipo AMPA y NMDA, respectivamente. Al final del experimento se comprobó que se trataba de

corrientes inhibitoras bloqueándolas con bicuculina (BIC [50 μ M]), un antagonista específico de receptores GABAérgicos tipo A (Figura 34A). Bajo estas condiciones experimentales, no se observaron diferencias significativas en la amplitud (Figura 34A, B; PRL: 117.81 % \pm 10.26, n= 8) o en la plasticidad sináptica a corto plazo (Figura 34A, C) de las IPSC en presencia de PRL. Analizando estos datos junto con los resultados obtenidos con registros extracelulares, podemos inferir que la PRL no actúa a través de receptores GABAérgicos tipo A situados en las neuronas piramidales de CA1 si no, posiblemente, por una acción directa o indirecta sobre las interneuronas GABAérgicas.

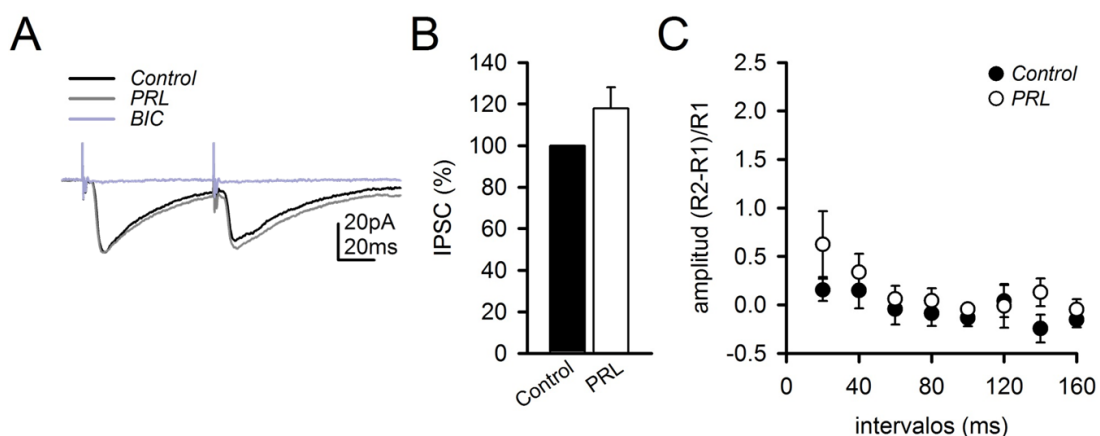


Figura 34. La PRL exógena no modifica las IPSC en neuronas piramidales de CA1 en hembras fértiles nulíparas. **A**, registros característicos de las IPSC en la región CA1 del hipocampo en condiciones controles, en presencia de PRL y tras su bloqueo con BIC [50 μ M]. **B**, la aplicación de PRL [200 nM] (\circ , n= 8) en el baño no produce un aumento significativo de las IPSC en neuronas de la región de CA1. **C**, tampoco se observaron cambios en la plasticidad sináptica a corto plazo en presencia de PRL.

Por otra parte, estudiamos, además, la participación de los componentes AMPA y NMDA de las corrientes excitadoras glutamatérgicas. En primer lugar, aislamos el componente AMPA bloqueando las corrientes NMDA y las IPSC, incorporando al baño sus respectivos antagonistas, D-APV [50 μ M] y PTX [100

μM], respectivamente (Figura 35A). La presencia de PRL [200 nM] no produce un aumento significativo en la amplitud de las corrientes AMPA (Figura 35B; $130.18\% \pm 14.11$, $n=4$) aunque claramente los valores tienden a ser mayores con respecto a las condiciones basales (Figura 35A, B). Por otra parte, no se observaron cambios en la facilitación por pares de pulsos (Figura 35C).

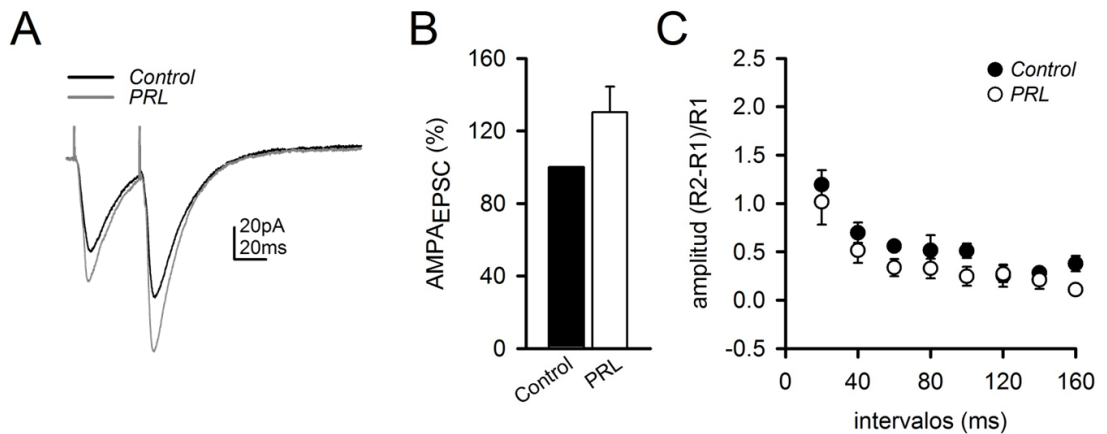


Figura 35. La PRL exógena no produce cambios en el componente AMPA de las corrientes glutamatérgicas. **A**, registros característicos de corrientes AMPA en la región CA1 del hipocampo en condiciones basales y en presencia de PRL. **B**, no hay cambios significativos en la amplitud de la corriente AMPA en presencia de PRL [200 nM] ($n=4$), aunque sus valores tienden a ser mayores que en sus condiciones basales. **C**, no se observan cambios en la PPF al aplicar la hormona al baño.

En segundo lugar, se aisló el componente NMDA, antagonizando las corrientes AMPA con CNQX [20 μM] y las IPSC con PTX [100 μM], además, se quitó el Mg^{2+} de la solución extracelular (Tabla 1) para liberar al receptor del bloqueo que produce este catión (Figura 36A). Para mantener la osmolaridad del aCFS se reemplazó el Mg^{2+} equimolarmente con Ca^{2+} . Si bien la PRL [200 nM] no incrementa significativamente la amplitud de la corriente NMDA (Figura 36B; $174.2\% \pm 51.25$, $n=6$) se observan valores que tienden a ser mayores que los

basales de manera similar a lo que ocurre con el componente AMPA (Figura 35A, B). Del mismo modo, la PRL no modifica la PPF (Figura 36C).

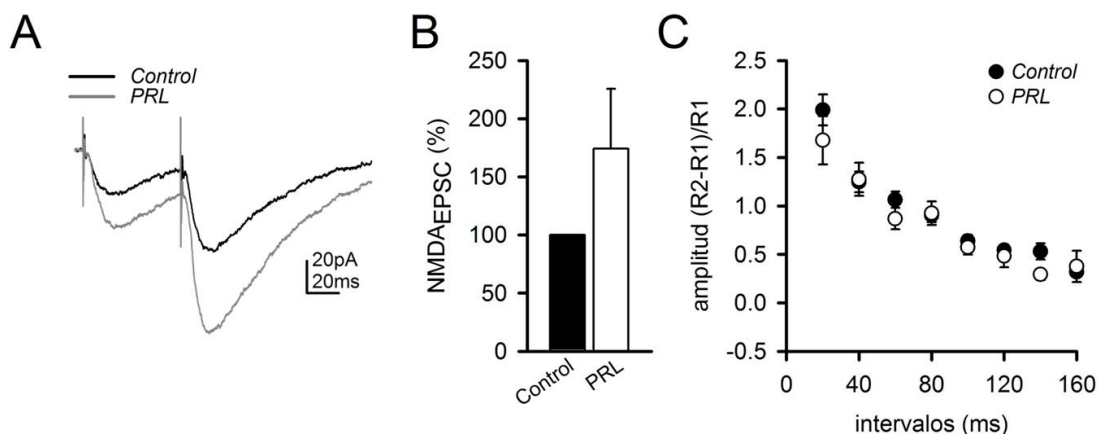


Figura 36. La PRL exógena no produce cambios en el componente NMDA de las corrientes glutamatérgicas. **A**, registros representativos de las corrientes NMDA en la región CA1 del hipocampo en condiciones basales y en presencia de PRL. **B**, no hay cambios significativos en la amplitud de la corriente NMDA en presencia de PRL [200 nM] (n= 6), aunque sus valores tienden a ser mayores que en sus condiciones basales. **C**, no se observan cambios en la PPF al aplicar la hormona al baño.

Como experimentos complementarios, estudiamos la relación de las corrientes NMDA y AMPA en animales tratados con PRL s.c. durante una semana utilizando las características de voltaje-dependencia del receptor NMDA para aislar ambos componentes (ver Materiales y Métodos), en vez de emplear una aproximación farmacológica. No se observaron cambios en el ratio NMDA/AMPA en estas condiciones experimentales (Figura 37A, B, Vehículo: 0.21 ± 0.0815 , n= 3; PRL: 0.3474 ± 0.0486 , n= 7) aunque se mantuvo una tendencia a ser mayor con respecto a las condiciones basales al igual que se observa en los estudios farmacológicos.

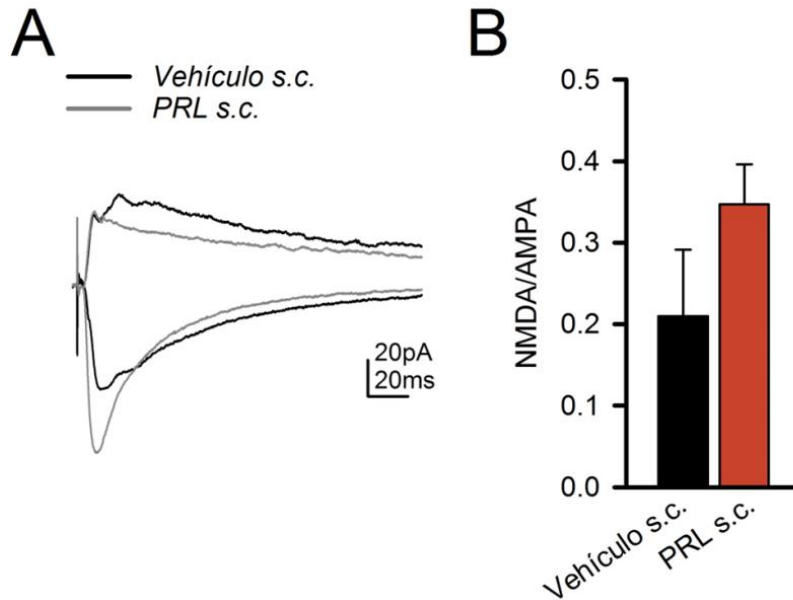


Figura 37. El tratamiento con PRL periférica no muestra diferencias en el ratio NMDA/AMPA. A, registros representativos de corrientes NMDA y AMPA aisladas por su voltaje-dependencia en la región CA1 del hipocampo B, el tratamiento con PRL s.c. muestra una tendencia a aumentar el ratio NMDA/AMPA (●, n= 3, ●, n= 7).

Por último, se estudió si la PRL modifica la excitabilidad de las neuronas de CA1 en condiciones de fijación de corriente. En presencia de PRL no se observaron cambios significativos en la frecuencia de disparo (Figura 38) al aplicar pulsos de corriente de intensidad creciente (Figura 38), confirmando que esta hormona no provoca cambios en las propiedades intrínsecas de membrana de estas células.

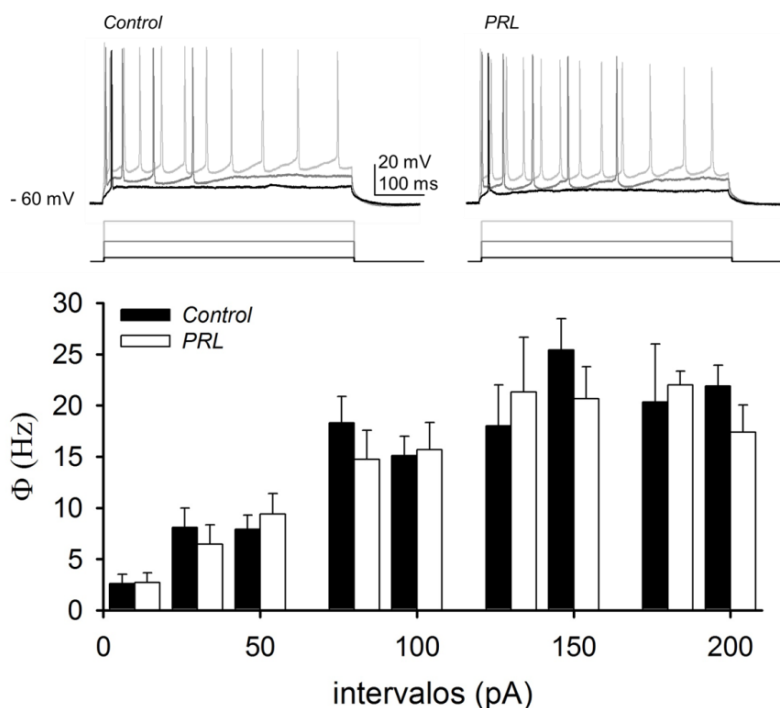


Figura 38. La PRL no modifica la excitabilidad de las neuronas piramidales de CA1. En el panel superior se observan trazos representativos de los PA obtenidos al despolarizar la célula con pulsos de corriente de 10 pA, 50 pA y 100 pA (500 ms de duración). En el panel inferior se muestran los valores promedios de la frecuencia de disparo para las distintas intensidades de corriente aplicadas.

En el control del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal intervienen diferentes hormonas como la LH, la FSH, la PRL y los estrógenos, las cuales mantienen un complejo mecanismo de regulación por retroalimentación. Para estudiar el papel de la PRL sobre la plasticidad sináptica del hipocampo anulando la función de este eje, realizamos experimentos en hembras fértiles ovariectomizadas (OVX) tres semanas después de la cirugía (ver Materiales y Métodos). No se observó LTP inducida por TBS en hembras OVX (Figura 39A, B; $109.59\% \pm 4.64$, $n=7$), en concordancia con datos experimentales previos (Córdoba Montoya y Carrer, 1997; Gureviciene et al., 2003). Por otra parte, la aplicación de PRL exógena [200 nM] en animales OVX produjo un incremento significativo en la PTP (Figura 39A, B;

OVX: $139.41 \% \pm 4.8$, $n=7$; OVX + PRL: $167.35 \% \pm 7.96$, $n=8$; $*p < 0.05$) sin lograr mantener la LTP (Figura 39A, B; $113.31 \% \pm 4.22$, $n=8$). Sin embargo, el tratamiento con PRL s.c. [200 μ g] durante 7 días ($n=13$) fue capaz de recuperar la LTP en hembras OVX (Figura 39A, B; $122.6 \% \pm 1.46$, $n=13$; $*p < 0.05$) incrementando, además, la PTP (Figura 39A, B; $170.31 \% \pm 8.58$, $n=13$; $**p < 0.01$). Estos datos demuestran que la PRL sistémica es capaz de recuperar la eficiencia sináptica en el hipocampo afectada por la supresión del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal.

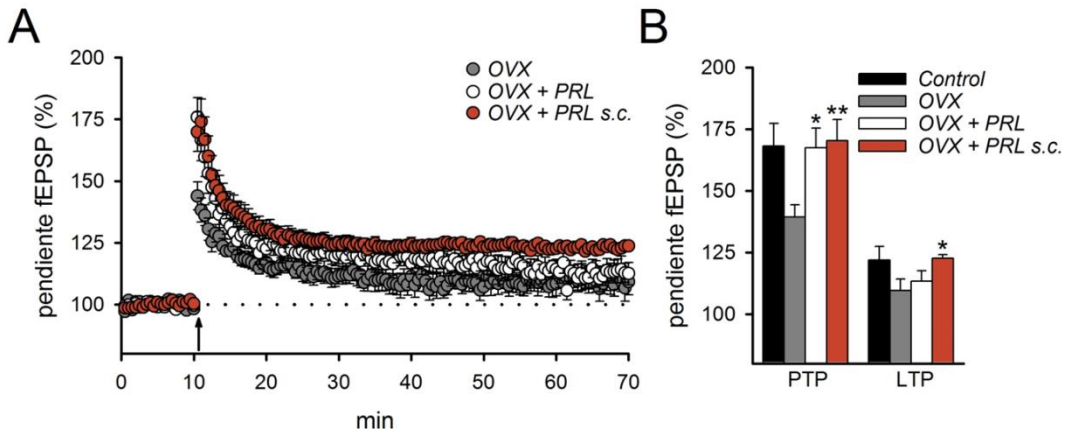


Figura 39. El tratamiento con PRL s.c. reestablece la eficacia sináptica del hipocampo en hembras OVX. **A**, curso temporal de los valores medios de la pendiente de los fEPSP en hembras OVX (●, $n=7$), en presencia de 200 nM PRL exógena (○, $n=8$) y tratadas con 200 μ g PRL s.c. durante una semana (●, $n=13$). **B**, gráfico de barras de los valores medios de las pendientes de los fEPSP para la PTP y la LTP en las distintas condiciones experimentales. Tanto la PRL exógena como subcutánea modifican de forma significativa la PTP pero sólo el tratamiento con PRL s.c. es capaz de reestablecer la LTP. Valores de significancia establecidos con $p < 0.05$ * y $p < 0.01$ **.

Dado que los estrógenos actúan sobre el hipotálamo modulando la secreción de GnRH y DA, disminuyendo los niveles de gonadotrofinas y estimulando la producción de PRL (Wersinger et al.; 1999; Brusco et al., 2008) realizamos tratamientos agudos de β - estradiol (3 μ g/Kg, 7 días; ver Materiales y Métodos) y

crónicos (Phan et al., 2012) en animales ovariectomizados. Tanto el tratamiento agudo de β -estradiol (Figura 40A, B; PTP: $142.9 \% \pm 12.84$, LTP: $112.08 \% \pm 5.76$, $n = 7$), como el tratamiento crónico (Figura 41A, B; PTP: $159.2 \% \pm 10.66$, LTP: $124.43 \% \pm 6.49$, $n = 7$), no recuperan la LTP *per se* pero facilitan la capacidad de la PRL exógena de aumentar la LTP en las sinapsis de CA1 (Figura 40A, B; $n = 7$, PTP: $170.76 \% \pm 7.93$, $**p < 0.01$; LTP: $124.25 \% \pm 3.54$, $*p < 0.05$; Figura 41A, B; $n = 7$; PTP: $207.69 \% \pm 22.74$, $*p < 0.05$; LTP: $127.51 \% \pm 11.9$, $*p < 0.05$). Por otra parte, el tratamiento crónico con β -estradiol en hembras no OVX incrementa la PTP (Figura 42A, B; Vehículo: $159.79 \% \pm 7.045$, $n = 12$; β -E: $204.43 \% \pm 13.35$, $n = 10$; $*p < 0.05$) pero no modifica los valores de LTP con respecto a sus controles tratados con vehículo (Figura 42A, B; $125.85 \% \pm 5.59$, $n = 12$). Un resumen comparativo de las distintas condiciones experimentales se muestra en la Figura 43.

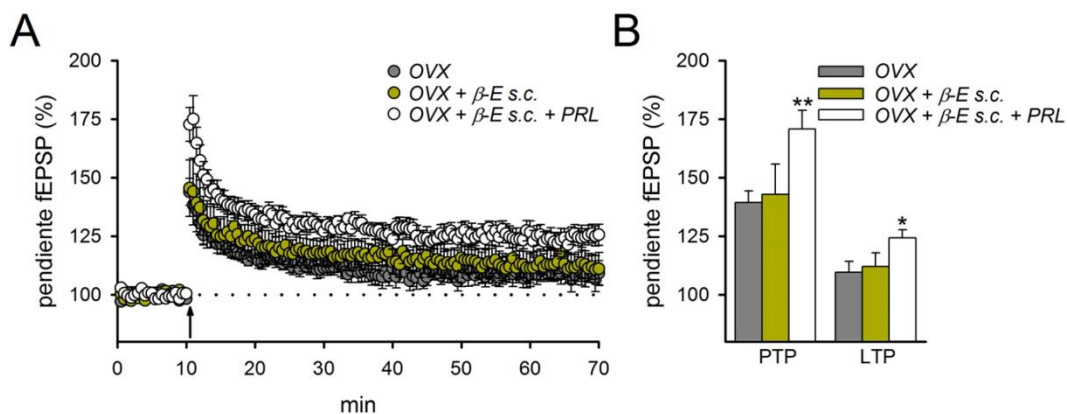


Figura 40. La PRL exógena modifica la plasticidad sináptica en hembras OVX tratadas en forma aguda con β -Estradiol. **A**, curso temporal de los valores medios de la pendiente de los fEPSP en hembras OVX (●, $n = 7$), OVX tratadas con una inyección de $3 \mu\text{g/Kg}$ β -Estradiol s.c. (●, $n = 7$) y en presencia de 200 nM PRL exógena (○, $n = 7$). **B**, gráfico de barras de los valores medios de las pendientes de los fEPSP para la PTP ($** p < 0.01$) y la LTP ($* p < 0.05$) en las distintas condiciones experimentales. La aplicación aguda de β -Estradiol s.c. no modifica la LTP en hembras OVX pero actúa sinérgicamente con la PRL exógena para reestablecer la eficacia sináptica.

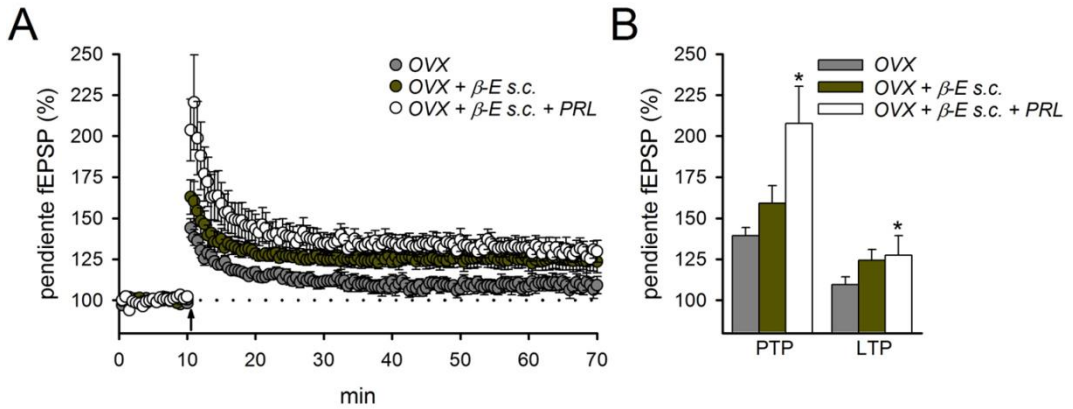


Figura 41. La PRL exógena modifica la plasticidad sináptica en hembras OVX tratadas crónicamente con β -Estradiol. **A**, curso temporal de los valores medios de la pendiente de los fEPSP en hembras OVX (●, $n=7$), OVX tratadas con 3 μ g/Kg β -Estradiol s.c. durante una semana (●, $n=7$) y en presencia de 200 nM PRL exógena (○, $n=7$). **B**, gráfico de barras de los valores medios de las pendientes de los fEPSP para la PTP (* $p<0.05$) y la LTP (* $p<0.05$) en las distintas condiciones experimentales. La asociación de PRL exógena y β -Estradiol crónico actúa sinérgicamente, al igual que en el tratamiento agudo, para mejorar la eficacia sináptica.

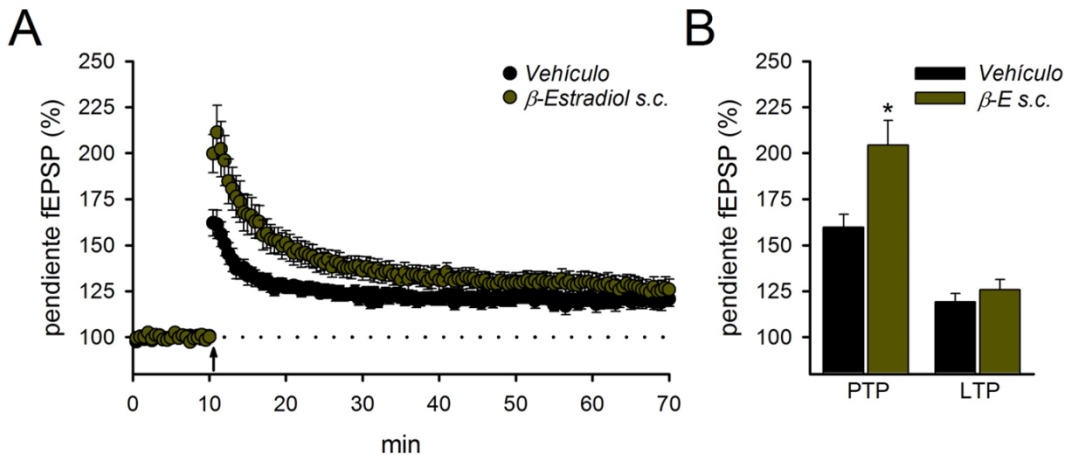


Figura 42. El tratamiento con β -Estradiol s.c. crónico en hembras fértiles no OVX no modifica la plasticidad sináptica a largo plazo. Curso temporal de la pendiente de los fEPSP (**A**) y gráfico de barras de los valores medios de PTP (** $p<0.01$) y LTP (**B**) en hembras fértiles nulíparas tratadas con vehículo (● $n=12$) y β -Estradiol s.c. (● $n=10$) durante 7 días.

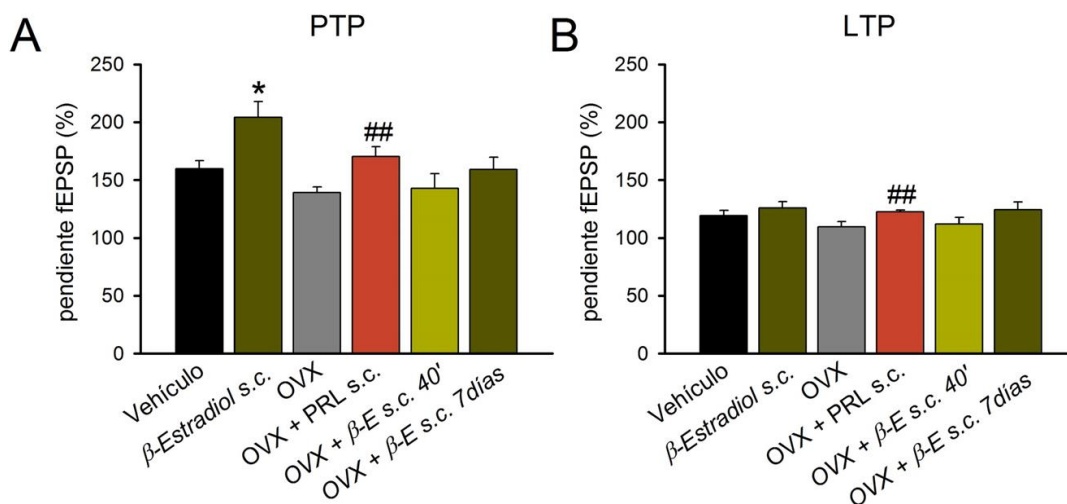


Figura 43. Gráficos de barras comparativos para las diferentes condiciones experimentales. A, valores medios de la PTP inmediatamente después de la aplicación del TBS. **B,** valores medios de la LTP a los 60 min de la aplicación del TBS. (* vs. Vehículo; ## vs. OVX). Datos obtenidos de las figuras 38, 39, 40 y 41.

Como un control periférico de los efectos de la supresión del eje hipotálamo-hipofisario-gonadal se analizó el peso de los úteros de los animales determinando un ratio en base al peso corporal (ver Materiales y Métodos) con el fin de comprobar la eficacia de los tratamientos y si existía una relación con los cambios observados en la plasticidad sináptica del hipocampo. Para el grupo control (Figura 44 A; $0.419 \% \pm 0.0379$, $n = 20$) y las hembras en periodo de lactancia (Figura 44A; L18-L20, $0.3684 \% \pm 0.055$, $n = 4$) la relación de peso se mantiene igual, pero se observan diferencias significativas en los tratamientos subcutáneos con PRL (Figura 44A; $0.2990 \% \pm 0.0213$, $n = 10$; $*p < 0.05$) y β -estradiol durante 7 días (Figura 44A, $0.8014 \% \pm 0.0443$, $n = 5$, $***p < 0.001$). Estos datos nos indican que la falta de cambios en la LTP del hipocampo (Figura 44B) no se debe a un fallo en el tratamiento ya que los mismos son efectivos en un órgano periférico diana como es el útero. Por otra parte, en hembras OVX disminuye el ratio de los úteros (Figura 44A; $0.1067 \% \pm 0.0136$, $n = 9$; $***p < 0.001$) debido a la

supresión hormonal del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal que se recupera a valores control tras el tratamiento con β -estradiol durante 7 días (Figura 44A; 0.4349 ± 0.0252 , $n = 7$; $### p < 0.001$) pero no con una sola inyección aguda. El tratamiento con PRL subcutánea disminuye el tamaño del útero (Figura 44A; 0.067 ± 0.005 , $n = 3$; $### p < 0.001$) al igual que sucede en las hembras fértiles nulíparas. Estos datos nos muestran la efectividad de las ovariectomías, así como la eficacia de los distintos tratamientos reforzando los resultados observados con los estudios electrofisiológicos (Figura 44B). Analizados en su conjunto estos datos nos indican que existe una acción sinérgica entre la PRL exógena y el β -estradiol y que la interacción entre estas hormonas es capaz de modular la plasticidad sináptica de la región CA1 en el hipocampo. Por otra parte, el tratamiento crónico con PRL es capaz de reestablecer la eficacia sináptica en condiciones en las que se disminuyen los niveles de estradiol, un efecto que puede ser muy relevante para entender la fisiología de las hembras durante el climaterio.

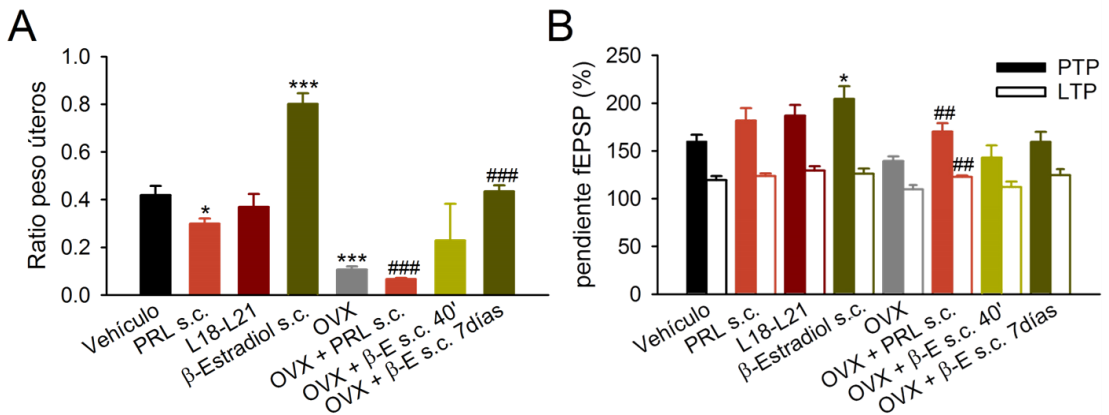


Figura 44. Valoración de los tratamientos en base al peso de los úteros. A, gráfico de barras que muestra el ratio del peso de lo úteros con respecto al peso del animal para las distintas condiciones experimentales. B, gráfico comparativo de los valores medios de PTP y LTP con fines comparativos (datos tomados de las figuras 24 y 43).

DISCUSIÓN

Evidencias experimentales y clínicas demuestran que las hormonas son capaces de modificar y regular la estructura y función del SN para una mejor adaptación al medio que nos rodea. La plasticidad sináptica es un elemento muy importante que contribuye a favorecer estos cambios en distintas fases del desarrollo o en condiciones fisiológicas particulares, como es el período gestacional, la lactancia y los cuidados postnatales en los mamíferos. Hasta el momento, la hormona más estudiada durante la lactancia y los cuidados postnatales ha sido la oxitocina, postulando que participa en los cambios estructurales y funcionales del SN en estas etapas. Se ha demostrado que la presencia de oxitocina [1 μ M] en rodajas de cerebro de ratón favorece un aumento de la LTP en la sinapsis de CA3-CA1 existiendo, además, diferencias entre hembras nulíparas y reproductoras aunque no se establecieron los valores de oxitocina en suero en el momento del experimento (Tomizawa et al., 2003). Dado que se conoce que la PRL regula la actividad de las neuronas oxitonérgicas en los núcleos supraópticos del hipotálamo en ratas gestantes y en periodo de lactación (Kokay et al., 2006; Augustine et al., 2017), es posible que tenga un papel relevante en este fenómeno de potenciación dada la estrecha vinculación entre estas dos hormonas en las condiciones descritas. La hormona del crecimiento (GH) está directamente relacionada con la regulación del crecimiento postnatal y el metabolismo (Forsyth y Wallis, 2002). Esta hormona también participa en la regulación de la función hipocampal ya que si se aplica en rodajas produce un aumento significativo de los fEPSP en las neuronas de CA1 (Mahmoud et al., 2006). Además, la GH forma parte de la misma familia de proteínas que la PRL, se expresan de forma similar en diferentes células de la

glándula pituitaria y en otras zonas no hipofisarias (Soares, 2004). Incluso, la GH se une al receptor de PRL imitando algunas de sus acciones (Forsyth y Wallis, 2002; Handwerger y Feemark, 2000). Se conoce que la PRL interviene en la fisiología del SNC y en el comportamiento durante la fase post-parto de la reproducción (Grattan, 2002). Además, tiene importantes acciones centrales de retroalimentación sobre su propia secreción (Ben-Jonathan y Hnasko, 2001). Algunos estudios indican que la PRL ejerce un efecto de protección sobre la neurogénesis adulta bajo condiciones crónicas de estrés en ratones. Por lo tanto, la PRL puede ser un factor de supervivencia de las neuronas en el hipocampo (Torner et al., 2009). Por otra parte, se ha demostrado que la administración de PRL a ratas nulíparas induce el comportamiento maternal, ya que existe una correlación positiva entre los niveles de PRL y la disminución en la latencia para el inicio del comportamiento maternal (Bridges et al., 1990; Bridges y Ronsheim, 1990). Estudios realizados en rata indican un aumento significativo de la concentración de espinas dendríticas en la región de CA1 del hipocampo en hembras gestantes y en periodo de lactancia (L5-L6) respecto a las diferentes etapas del ciclo estral (Kinsley et al., 2006). Estas condiciones se corresponden con concentraciones altas de PRL en suero, que destacan notablemente respecto al resto de hormonas que intervienen (Brusco et al., 2008). No obstante, el papel de la PRL sobre la regulación de la actividad neuronal y la plasticidad sináptica son poco conocidos a pesar de jugar un rol fundamental durante la lactancia y las primeras etapas del cuidado postnatal. Los resultados obtenidos en este trabajo demuestran, por primera vez, que la PRL aplicada exógenamente en rodajas de cerebro de ratones, hembras fértiles nulíparas, produce cambios en la plasticidad sináptica a corto y largo plazo en las sinapsis CA3-CA1 del hipocampo. La regulación a corto plazo se manifiesta como un cambio en la PTP y en la PPF indicando que la PRL puede actuar presinápticamente modificando la probabilidad de liberación de

neurotransmisor (Zucker, 1989; Atwood y Karunanithi, 2002). Por otra parte, se observó que, en presencia de esta hormona, se produce un incremento en la LTP que no depende de modificaciones en la transmisión sináptica basal ni en la excitabilidad del circuito. Estos cambios en la plasticidad sináptica inducidos por la PRL son dosis dependientes, llegando a un nivel de saturación con concentraciones por encima de 200 nM. Los niveles de PRL en sangre sufren variaciones en función del género (hembra, macho), diferentes condiciones fisiológicas (i.e. estrés, ciclo estral, lactancia) y patológicas (i.e., adenoma hipofisario). Los valores de PRL en suero de roedores y humanos machos se encuentran en un rango de 5-20 ng/mL (Michael et al., 1980), en roedores hembras la concentración de PRL alcanza un pico de 120-150 ng/mL en la tarde del proestro al estro que disminuye a 30-60 ng/mL durante el diestro (McLean et al., 2012). Sin embargo, en mujeres los valores de PRL en suero durante el ciclo menstrual se mantienen estables entre 10-60 ng/mL. Durante la gestación, la concentración de PRL alcanza valores de 200-300 ng/mL, manteniéndose durante la lactancia. En el caso de los roedores tiende a caer a mitad de este periodo (Brusco et al., 2008; Guillou et al., 2015) pero en las mujeres se mantiene mientras exista la estimulación del pezón (McNeilly, 2001). En condiciones patológicas, como es el caso de un adenoma hipofisario, pueden alcanzarse valores cuatro veces o más por encima de la concentración normal en suero (Serri et al., 2003). Si bien en nuestras condiciones experimentales los cambios en la plasticidad sináptica se pusieron de manifiesto a dosis elevadas, podemos considerarlas dentro de un rango al que puede llegarse en ciertas condiciones fisiológicas y, claramente, en situaciones patológicas. Esta observación se ve reforzada por el hecho que no existe este efecto en hembras inmaduras sexualmente y en machos, lo que nos indica que es necesaria una serie de condiciones en cuanto a la disponibilidad de receptores de PRL y su función dependiendo del género. Durante la gestación y la lactancia aparecen nuevos

receptores de PRL en zonas del cerebro donde no hay durante el ciclo estral (Pi y Grattan, 1999; Pi y Voogt, 2001; Augustine et al., 2003). Por otra parte, se conoce que los estrógenos inducen un incremento de la expresión del receptor de PRL (Shamgochian et al., 1995). No obstante, existe la posibilidad de que la propia PRL pueda mediar la autorregulación de sus receptores (Muccioli y Di Carlo, 1994). Por lo tanto, no podemos descartar que la incubación previa durante al menos 20 minutos con PRL de las rodajas y la presencia en el baño durante el experimento tenga la capacidad de regular la formación de receptores de PRL. Los estudios realizados en hembras en período de lactancia entre el día 18 y 21 no mostraron cambios con respecto a las condiciones experimentales control. Es posible que esto se deba al día del destete en el que realizamos el experimento ya que, como se mencionara, la concentración de PRL durante la lactancia aumenta hasta el día L12-L14 para luego disminuir rápidamente (Brusco et al., 2008; Guillou et al., 2015). En el caso en el que se trataron hembras fértiles nulíparas con PRL s.c. para obtener concentraciones estables de la hormona, tampoco se observaron cambios en la plasticidad sináptica. Al no conocer la concentración de PRL sérica vs. líquido cefalorraquídeo, no podemos descartar que el eje hipotálamo-hipofisario sea capaz de regular el brusco aumento de PRL provocado por la administración subcutánea. Otra explicación, es que el sistema de transporte de los plexos coroideos se sature y no se alcancen valores suficientes de PRL en el SN como para producir cambios en la plasticidad sináptica del hipocampo.

La regulación de la expresión y función tanto de receptores excitadores glutamatérgicos como inhibidores GABAérgicos es una pieza fundamental de los mecanismos subyacentes a los cambios plásticos sinápticos que ocurren en el SN. Además, modificaciones del balance excitador-inhibidor pueden ser determinantes para la inducción y/o consolidación de la plasticidad sináptica a corto y largo plazo

(Collingridge et al., 2004). Existe una extensa evidencia experimental que indica que el receptor de glutamato tipo AMPA contribuye a la expresión de la LTP, no solo por la modulación de la actividad de receptores ya expresados en la sinapsis sino, también, por el rápido reclutamiento de nuevos receptores AMPA que alteran el número ya presente en la sinapsis (Benke et al., 1998; Liu y Cull-Candy, 2000; Palmer et al., 2004). Por otro lado, el receptor de glutamato tipo NMDA es el elemento más conocido responsable de las modificaciones a largo plazo de la eficacia sináptica. Su activación está involucrada en la inducción de la LTP, la depotenciación y la generación de la *novο* LTD en la mayoría de las sinapsis investigadas. Estos receptores también contribuyen a la transmisión sináptica de alta frecuencia. Además, la transmisión sináptica mediada por receptores NMDA puede modularse así misma durante la plasticidad sináptica, un proceso que se denomina metaplasticidad (Collingridge et al., 2004). No obstante, se desconoce si la PRL es capaz de modular este tipo de receptores. Existen evidencias experimentales contradictorias que indican, por un lado, que la administración de glutamato induce un incremento significativo de la liberación de PRL mientras que, por el contrario, antagonistas no competitivos de NMDA disminuyen los niveles de PRL en plasma y atenúan el incremento preovulatorio de PRL (Nagy et al., 2005). Los resultados obtenidos en el presente trabajo muestran que la PRL no modifica significativamente el componente AMPA o NMDA de las corrientes excitadoras glutamatérgicas aisladas farmacológicamente o por su dependencia de voltaje empleando técnicas de patch-clamp. Estos datos sugieren que estos receptores no son regulados en presencia de PRL y que los cambios en la LTP producida por esta hormona posiblemente no dependan de modificaciones en la actividad excitadora glutamatérgica. No obstante, se observa cierta tendencia a un incremento de ambos componentes en presencia de PRL y nuevos experimentos serán necesarios para

confirmar el papel de estos receptores en la regulación de la transmisión sináptica por la PRL.

Los receptores GABAérgicos son, también, elementos críticos en la plasticidad sináptica. Por ejemplo, colaboran en la activación de los receptores NMDA durante la transmisión sináptica a alta frecuencia (Bliss y Collingridge, 1993). Por otra parte, la transmisión sináptica dependiente de receptores GABA puede por sí misma modificarse mientras ocurren los cambios plásticos mediados por las sinapsis inhibitoras (Gaiarsa et al., 2002). Durante la pubertad, es crítico el papel de las subunidades $\alpha 4\beta\delta$ GABA_A en el aprendizaje y el mantenimiento de la plasticidad sináptica a largo plazo (Shen et. al, 2010). En la gestación, existe una expresión específica del receptor de PRL en neuronas GABAérgicas del hipotálamo (Kokay et al., 2011) y modificaciones en la expresión y función de receptores GABA_A extrasinápticos que persisten tras el parto (Sanna et al., 2009). También, se han observado cambios en la excitabilidad neuronal del hipocampo y otras regiones del SN por una regulación a la baja de la subunidad δ GABA_A (Maguire et al., 2009). Durante la lactancia se ha demostrado que existe un incremento de la actividad de neuronas GABAérgicas y de los niveles de GABA en el líquido cefalorraquídeo (Qureshi et al., 1987; Kornblatt y Grattan, 2001). Por otra parte, la hiperprolactinemia crónica aumenta la actividad de neuronas GABAérgicas del hipotálamo (Felman y Tappaz, 1989). Todos estos estudios, sustentan la posibilidad de que niveles altos de PRL modifican el sistema inhibitor GABAérgico. Sin embargo, no se conoce si la PRL puede regular directa o indirectamente la transmisión sináptica inhibitora mediada por estos receptores. Los datos experimentales presentados en este trabajo indican que los receptores GABA_A están involucrados en las modificaciones de la plasticidad a largo plazo provocada por la PRL exógena en el hipocampo, ya que se bloquea su efecto sobre

la LTP con un antagonista específico. Además, es importante destacar que al aislar farmacológicamente las corrientes inhibitoras en CA1 provocadas por la estimulación de las SCs, empleando técnicas de patch-clamp, no se observó ningún efecto de la PRL exógena. Analizando estos datos junto con los obtenidos con registros extracelulares, podemos deducir que la PRL no está actuando sobre receptores GABA_A localizados en las neuronas piramidales de CA1. Por lo tanto, la explicación más lógica es que esta hormona esté modificando, directa o indirectamente, la actividad de las interneuronas GABAérgicas. En este punto, y teniendo en cuenta la participación de los astrocitos en la regulación de la plasticidad sináptica (Araque et al., 2014) y que, además, existen evidencias experimentales que la PRL es capaz de modificar la señal de Ca²⁺ astrocitaria (Ducret et al., 2002), no podemos descartar que estas células puedan mediar la acción de la PRL sobre la actividad inhibitoria que contribuye al aumento de la eficacia sináptica en CA3-CA1.

Evidencias experimentales obtenidas por distintos laboratorios demuestran que la PRL puede regular específicamente la circuitería neuronal ejerciendo un control no solo sobre la neurotransmisión sino, también, sobre la excitabilidad neuronal modificando las propiedades intrínsecas de las neuronas hipotalámicas, de la región tuberinfundibular y sensoriales (Patil et al., 2014). No obstante se desconoce su acción sobre la excitabilidad de las neuronas del hipocampo y, en particular, de la región de CA1. Nuestros datos demuestran que la PRL no modifica la excitabilidad de las neuronas de CA1 por lo que podemos descartar que esta hormona, a diferencia de lo observado en otras regiones, pueda provocar cambios en las conductancias de membrana de estas células. Por lo tanto, aparentemente la PRL solo actúa a nivel sináptico en esta región del SN.

Como se mencionara, el mayor regulador de la liberación de PRL es la DA liberada por las neuronas TIDA. Se han realizado estudios sobre los receptores dopaminérgicos involucrados en la actividad de estas neuronas, los resultados sugieren que la activación de receptores D_1 inhibe la función de las neuronas TIDA, mientras que hay una acción estimuladora a través de los receptores D_2 . Por otra parte, la activación simultánea de ambos receptores anula sus respectivas acciones sobre estas neuronas hipotalámicas dopaminérgicas (Durham et al., 1998). Además, se conoce que las neuronas TIDA en el núcleo arcuato se activan de forma similar tanto en hembras como en machos en presencia de un agonista del D_2 (quinelorano), pero en hembras tiene un efecto inhibidor tónico sobre las células lactótrofes de la hipófisis anterior suprimiendo la secreción de PRL (Demarest y Moore, 1981; Eaton et al., 1993; Ben-Jonathan y Hnasko, 2001). En base a los estudios descritos existe la posibilidad de una activación o inhibición simultánea de los receptores D_1 y D_2 , capaz de cancelar las acciones mediadas por estos receptores sobre las neuronas TIDA. Además, se ha demostrado que, a pesar de que hay una disminución de secreción de DA en hembras lactantes respecto a hembras vírgenes (medida por amperimetría), no existen diferencias en la actividad eléctrica de neuronas TIDA en presencia de PRL (Romanò et al., 2013). El tratamiento con antagonistas del receptor D_2 produce un aumento significativo de la concentración de PRL en plasma en hembras vírgenes pero no se produce este incremento en hembras lactantes (Romanò et al., 2013). Por otro lado, se conoce que los receptores de DA pueden modular la plasticidad sináptica en el hipocampo. Se ha demostrado que ratones deficientes del receptor D_1 presentan una disminución de la LTP (Granado et al., 2008) y que también hay cambios en la plasticidad sináptica mediada por metanfetamina en presencia de antagonistas de los receptores D_1 y D_2 (Swant et al., 2010; Zhu et al., 2012). Nuestros resultados muestran que la modificación de la eficacia sináptica en el hipocampo mediada por

la PRL exógena está regulada por los receptores dopaminérgicos del tipo D₁ y D₂ sugiriendo, por primera vez, una interrelación entre ambas más allá de la regulación que se observa en otras zonas del SN como el hipotálamo. Por otra parte, la presencia de PRL modifica la transmisión sináptica basal y la excitabilidad axonal cuando se bloquea la actividad de los receptores dopaminérgicos, reforzando la idea de una importante interacción PRL-receptores dopaminérgicos en estructuras del SN extra-hipotalámicas.

La vía de señalización del JAK/STAT es la mejor caracterizada de las vías activadas por la PRL. Esta vía principalmente regula la expresión génica y la activación de receptores a través de la unión de polipéptidos como hormonas, factores de crecimiento o citoquinas que desencadena la fosforilación de JAK (Nicolas et al., 2013). Aunque la expresión de JAK y STAT en el SNC es más débil que en otros sistemas, diferentes estudios han demostrado que estas proteínas podrían expresarse en varias áreas del cerebro, por ejemplo en el corteza cerebral, hipocampo, hipotálamo y cerebelo (Nicolas et al., 2013). Se ha observado que la inhibición de la vía JAK/STAT induce un deterioro de la memoria (Chiba et al., 2009). El tratamiento con AG490, un antagonista de JAK2/STAT3, en un modelo de enfermedad de Alzheimer (AD, del inglés Alzheimer's disease) produce una disminución de la función cognitiva respecto a animales control y el efecto de inactivación de la vía JAK2 en neuronas del hipocampo a través de la administración intracerebroventricular de AG490 es dosis dependiente en animales controles (Chiba et al., 2009). La PRL es el principal mediador de la activación de STAT5 en el SN que se utiliza como un marcador fiable de que las neuronas responden a la PRL (Bole-Feysot et al., 1998; Brown et al., 2010). Experimentos realizados en ratones hembra deficientes del N-STAT5 no muestran diferencias en el comportamiento maternal en comparación con hembras controles a pesar de que

se observan diferencias en la producción de leche entre las dos condiciones (Buonfiglio et al., 2015). Actualmente, se conoce la participación de JAK2 y STAT3 en la plasticidad sináptica del hipocampo. Se ha demostrado que esta vía desempeña un papel esencial en la inducción de la LTD dependiente del receptor NMDA ya que este fenómeno es bloqueado cuando se inhibe la vía JAK/STAT, pero no afecta la LTP (Nicolas et al., 2012). Nuestros resultados se corresponden con estos estudios ya que cuando inhibimos la vía de señalización JAK/STAT con el antagonista específico AG490 no tenemos cambios en al LTP en el hipocampo con respecto a nuestras condiciones control. No obstante, la presencia del antagonista bloquea el incremento de la potenciación sináptica producido por la PRL exógena. Por lo tanto, los cambios plásticos sinápticos inducidos por la PRL implican la fosforilación de JAK2, inicialmente a través de receptores de PRL, pero no podemos descartar que la presencia de PRL tenga la capacidad de activar esta vía a través de receptores NMDA.

Los estrógenos tienen varios efectos sobre la plasticidad sináptica en el hipocampo. Incrementan la excitabilidad de neuronas (Terasawa y Timiras, 1968; Wong y Moss, 1992), mejoran la LTP (Wong y Moss, 1992; Warren et al., 1995; Córdoba Montoya y Carrer, 1997; Gureviciene et al., 2003; Foy et al., 2004; Liu et al., 2008) y producen importantes cambios en la morfología de espinas dendríticas regulando funciones como el aprendizaje y la memoria (Li et al., 2004; Liu et al., 2008; Phan et al., 2012). Existen evidencias experimentales en el hipocampo de rata que muestran un aumento de la LTP en hembras la tarde del proestro (correspondiente con concentraciones altas de PRL y progesterona en suero) frente a la mañana de diestro, proestro y estro donde los valores de potenciación son similares (Warren et al., 1995; Bi et al., 2001). También hay diferencias significativas en las curvas estímulo/respuesta post-LTP entre las hembras en

proestro y machos durante la tarde (Warren et al., 1995). Además, en rodajas de hipocampo de ratones hembra OVX tratadas con 17β -estradiol se observa un aumento de la potenciación en las sinapsis CA3-CA1 respecto a hembras OVX no tratadas, tras la estimulación con un protocolo TBS. Este aumento en la LTP es bloqueado en presencia de antagonistas de receptores tipo NMDA (Gureviciene et al., 2003). Este efecto del estradiol también se observa en experimentos realizados *in vivo* en ratas OVX anestesiadas, donde se observa una recuperación de la LTP (Córdoba Montoya y Carrer, 1997). Además, estudios previos indican que el tratamiento agudo con β -estradiol aumenta significativamente la densidad de espinas dendríticas en el SR del hipocampo (Phan A. et al, 2012). Nuestros datos experimentales concuerdan con los hallazgos de estos grupos, ya que observamos un fallo de la LTP inducida por un TBS en hembras OVX. En estas condiciones experimentales se realizaron tratamientos subcutáneos con β -estradiol tanto agudos como crónicos a dosis en las que no se observa una recuperación significativa de la LTP a los valores observados en hembras no OVX, aunque sí se manifiesta cierta tendencia más marcada en el caso de los tratamientos crónicos. Notablemente, sólo la administración de PRL exógena en las rodajas logra recuperar la PTP y la LTP de forma significativa. Las hormonas sexuales son necesarias para una respuesta normal de la PRL ya que hembras OVX muestran un número reducido de neuronas inmunoreactivas al pSTAT5 inducidas por PRL en diferentes áreas del cerebro. Por otro lado, la mayoría de las neuronas sensibles a la PRL también expresan el receptor de estrógenos α (ER α) (Furigo et al., 2014). Estudios previos en ratones OVX tratados con estradiol muestran que son significativamente más sensibles a la PRL que las OVX no tratadas (Anderson et al., 2008). La alta coexpresión de ARNm de pSTAT5-ir y ER α en varios núcleos indica una posible diafonía entre los receptores de PRL y estrógenos. Los hallazgos obtenidos a partir del presente trabajo muestran, por primera vez, una recuperación significativa de los valores de

potenciación sináptica a corto y largo plazo en hembras OVX tratadas con PRL s.c. durante 7 días que se correspondió con los valores obtenidos en hembras fértiles. Esta recuperación de la LTP no se observó con la aplicación de PRL exógena en las rodajas de hembras OVX, pero si se obtuvo un aumento significativo de la PTP, indicando un incremento en la liberación de neurotransmisor. Por el momento no conocemos cuál pueda ser el mecanismo de esta interacción estrógeno-PRL a nivel sináptico, pero se conoce que la capacidad de los estrógenos para aumentar la señalización de PRL no requiere necesariamente la coexpresión de los receptores de PRL y ER α y es posible que esto ocurra por mecanismos indirectos (Furigo et al., 2014). Aunque el estrógeno es importante en la regulación de la PRL, la PRL podría considerarse una hormona regulada dualmente, donde tanto el estrógeno como estados particulares (i.e.,estrés, inflamación) influyen en los niveles de PRL en la sangre.

Evidencias clínicas (Bove et al., 2014) y experimentales en modelos animales establecen una correlación entre estrógenos y la enfermedad de Alzheimer. Trabajos preliminares en roedores han demostrado un incremento significativo del β -amiloide en el cerebro de hembras OVX frente a sus controles que disminuye tras el tratamiento con 17 β -estradiol (Petanceska et al., 2000; Jayaraman et al., 2012). Del mismo modo, en modelos de AD en ratones transgénicos, se ha observado una aceleración significativa de la acumulación del β -amiloide y un empeoramiento en la valoración clínica en las hembras OVX en comparación con las no OVX que, al igual que en animales no transgénicos, disminuye con el tratamiento con 17 β -estradiol (Levin-Allerhand et al., 2002; Zheng et al., 2002; Carroll et al., 2007; Zhao et al., 2011). No obstante, estas alteraciones de las concentraciones del β -amiloide no se observan en todas las cepas transgénicas (Heikkinen et al., 2004; Green et al., 2005; Golub et al., 2008). Por otra parte, también hay hallazgos en paralelo realizados en humanos, donde el

tratamiento con estrógenos está asociado con la protección contra esta patología (Craig y Murphy, 2010). Por lo tanto, podemos deducir que concentraciones bajas de estrógenos están asociadas con la enfermedad de Alzheimer. Sin embargo, se desconoce el papel que pueda tener la PRL en esta y otras patologías neurodegenerativas que cursen con un cuadro clínico de demencias y, a la luz de los hallazgos presentados en este trabajo, puede ser relevante el estudio de cómo la PRL modifica la plasticidad sináptica en relación con estas enfermedades. Trabajos recientes han demostrado que la eficacia protectora de los estrógenos en los roedores no transgénicos y transgénicos del AD es regulada por la progesterona (Carroll et al., 2010; Jayaraman et al., 2012) y disminuye durante el envejecimiento (Palm et al., 2014). Dado que el cociente estrógeno/progesterona es fundamental en la regulación de la PRL durante la gestación y que nuestros resultados, en su conjunto, demuestran por primera vez que la PRL sistémica es capaz de recuperar la eficiencia sináptica en el hipocampo afectada por la supresión del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal, debe tenerse en cuenta el papel de todas las hormonas en su conjunto para comprender de qué manera el SE interactúa con el SN para provocar cambios en la plasticidad sináptica. Por otra parte, es importante destacar que existe una sinergia entre la actividad de la PRL y los estrógenos que es fundamental en la regulación de la transmisión sináptica. Los hallazgos expuestos en este trabajo de tesis doctoral son completamente originales y por primera vez ponen en evidencia la capacidad de la PRL de modificar la plasticidad sináptica en el Hipocampo y cómo esta hormona puede interaccionar con el estradiol para provocar cambios en situaciones fisiológicas tan poco conocidas como el climaterio. Estos datos aportan un sustrato celular que puede ayudarnos a comprender los cambios conductuales que se observan en los mamíferos en distintas etapas de su desarrollo y en algunas patologías neurodegenerativas que cursan con fallos cognitivos.

Conclusiones

1. La Prolactina regula la plasticidad sináptica a corto y largo plazo en el hipocampo de una manera dosis-dependiente, sin modificar la transmisión sináptica basal, la excitabilidad del circuito o las propiedades intrínsecas de las neuronas, incrementando, además, la probabilidad de liberación de neurotransmisor.

2. Este fenómeno se observa en forma aguda y solo en hembras sexualmente maduras.

3. El aumento de PRL sistémica por causas fisiológicas (hembras en período de lactación) muestran una tendencia a incrementar la LTP sin llegar a ser significativo, mientras su disminución experimental inducida farmacológicamente (cabergolina) no modifica la plasticidad sináptica en el hipocampo.

4. La PRL modifica la actividad inhibitora mediada por receptores tipo GABA_A, contribuyendo este mecanismo al aumento de la eficacia sináptica. Esta acción no se realiza a través de receptores GABA_A en las neuronas piramidales de CA1 si no, posiblemente, por una acción sobre las interneuronas GABAérgicas o indirectamente (i.e. astrocitos).

5. Existe una importante contribución de los receptores dopaminérgicos tipo D₁ y D₂ al mecanismo de regulación por el que la PRL modifica la eficacia sináptica en el hipocampo. Por otra parte, la PRL es capaz de modificar la transmisión sináptica basal y la excitabilidad axonal cuando disminuye la actividad de los receptores dopaminérgicos.

6. Los cambios plásticos sinápticos inducidos por la PRL implican la fosforilación de JAK2 y la activación de su respectiva cascada de señalización.

7. La PRL *per se* produce un aumento significativo en la amplitud de las corrientes sinápticas tanto en hembras fértiles nulíparas como en hembras inmaduras, no observándose cambios significativos en los componentes AMPA y NMDA de las corrientes glutamatérgicas aunque se observa una tendencia a aumentar tanto la amplitud como el ratio de dichos componentes.

8. A diferencia de la PRL aplicada exógenamente, la PRL sistémica no modifica la plasticidad sináptica a corto o largo plazo. Sin embargo, es capaz de recuperar la eficiencia sináptica en el hipocampo cuando es afectada por la supresión del eje hipotálamo-hipofisiario-gonadal. Estos datos pueden ser relevantes para entender la fisiología neurohormonal de las hembras durante el climaterio.

9. Existe una acción sinérgica entre la PRL exógena y el β -estradiol y la interacción entre estas hormonas es capaz de modular la plasticidad sináptica de la región CA1 en el hipocampo.

10. Los datos presentados en este trabajo constituyen la primera evidencia experimental de que la Prolactina puede modificar la plasticidad sináptica en el Hipocampo y representar un sustrato celular a los cambios conductuales observados en los mamíferos durante la maternidad.

Bibliografía

- Amaral DG, Witter MP (1989) The three-dimensional organization of the hippocampal formation: a review of anatomical data. *Neuroscience*. 31:571–591. Review.
- Andersen JR (1990) Decidual prolactin. Studies of decidual and amniotic prolactin in normal and pathological pregnancy. *Dan Med Bull* 37: 154–165.
- Anderson GM, Kieser DC, Steyn FJ, Grattan DR (2008) Hypothalamic prolactin receptor messenger ribonucleic acid levels, prolactin signaling, and hyperprolactinemic inhibition of pulsatile luteinizing hormone secretion are dependent on estradiol. *Endocrinology*. 149: 1562–1570.
- Andersson S, Minjarez D, Yost NP, Word RA (2008) Estrogen and progesterone metabolism in the cervix during pregnancy and parturition. *J Clin Endocrinol Metab*. 93: 2366–2374.
- Andrews ZB (2005) Neuroendocrine regulation of prolactin secretion during late pregnancy: easing the transition into lactation. *J Neuroendocrinol*. 17: 466–473.
- Aniksztejn L, Ben-Ari Y (1991) Novel form of long-term potentiation produced by a K⁺ channel blocker in the hippocampus. *Nature* 349: 67–69.
- Araque A, Carmignoto G, Haydon PG, Oliet SH, Robitaille R, Volterra A (2014) Gliotransmitters travel in time and space. *Neuron*. 81:728–739.
- Atwood HL, Karunanithi S (2002) Diversification of synaptic strength: presynaptic elements. *Nat Rev Neurosci* 3: 497–516.
- Augustine RA, Kokay IC, Andrews ZB, Ladyman SR, Grattan DR (2003) Quantitation of prolactin receptor mRNA in the maternal rat brain during pregnancy and lactation. *J Mol Endocrinol*. 31: 221–232.
- Augustine RA, Ladyman SR, Bouwer GT, Alyousif Y, Sapsford TJ, Scott V, Kokay IC, Grattan DR, Brown CH (2017) Prolactin regulation of oxytocin neurone activity in pregnancy and lactation. *J Physiol*. 595: 3591–3605.
- Baird DR, McNeilly AS, Sawers RS, Sharpe RM (1979) Failure of estrogen-induced discharge of luteinizing hormone in lactating women. *Clin Endocrinol Metab*. 49: 500–506.
- Baker BL, Gross DS (1978) Cytology and distribution of secretory cell types in the mouse hypophysis as demonstrated with immunocytochemistry. *Am J Anat*. 153: 193–215.
- Bell CC, Han VZ, Sugawara Y, Grant K (1997) Synaptic plasticity in a cerebellum-like structure depends on temporal order. *Nature*. 387: 278–281.

- Belchetz PE, Plant TM, Nakai Y, Keogh EJ, Knobil E (1978) Hypophysial responses to continuous and intermittent delivery of hypothalamic gonadotropin-releasing hormone. *Science*. 202: 631–633.
- Bellofiore N, Ellery SJ, Mamrot J, Walker DW, Temple-Smith P, Dickinson H (2017) First evidence of a menstruating rodent: the spiny mouse (*Acomys cahirinus*). *Am J Obstet Gynecol*. 216: 40.e1–40.e11. doi: 10.1016/j.ajog.2016.07.041.
- Ben-Jonathan N (1985) Dopamine: a prolactin-inhibiting hormone. *Endocr Rev*. 6: 564–589. Review.
- Ben-Jonathan N, Hnasko R (2001) Dopamine as a prolactin (PRL) inhibitor. *Endocr Rev*. 22: 724–763. Review.
- Ben-Jonathan N, LaPensee CR, LaPensee EW (2008) What can we learn from rodents about prolactin in humans? *Endocr Rev*. 29: 1–41. Review.
- Ben-Jonathan N, Mershon JL, Allen DL, Steinmetz RW (1996) Extrapituitary prolactin: distribution, regulation, functions, and clinical aspects. *Endocr Rev*. 17: 639–669.
- Ben-Jonathan N, Munsick RA (1980) Dopamine and prolactin in human pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab*. 51: 1019–1025.
- Ben-Jonathan N, Oliver C, Weiner HJ, Mical RS, Porter J C (1977) Dopamine in hypophysial portal plasma of the rat during the estrous cycle and throughout pregnancy. *Endocrinology*. 100: 452–458.
- Benke TA, Luthi A, Isaac JT, Collingridge GL (1998). Modulation of AMPA receptor unitary conductance by synaptic activity. *Nature*. 393: 793–797.
- Berlanga JJ, Gualillo O, Buteau H, Applanat M, Kelly PA, Edery M (1997) Prolactin activates tyrosyl phosphorylation of insulin receptor substrate 1 and phosphatidylinositol-3-OH kinase. *J Biol Chem*. 272: 2050–2052.
- Bi GQ, Poo MM (1998) Synaptic modifications in cultured hippocampal neurons: dependence on spike timing, synaptic strength, and postsynaptic cell type. *J Neurosci*. 18: 10464–10472.
- Bi R, Foy MR, Vouimba RM, Thompson RF, Baudry M (2001) Cyclic changes in estradiol regulate synaptic plasticity through the MAP kinase pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 98: 13391–13395.
- Björklund A, Moore RY, Nobin A, Stenevi U (1973) The organization of tubero-hypophyseal and reticulo-infundibular catecholamine neuron systems in the rat brain. *Brain Res*. 51:171–191.

- Blake CA (1976) Effects of intravenous infusion of catecholamines on rat plasma luteinizing hormone and prolactin concentrations. *Endocrinology*. 98: 99–104.
- Blanks AM, Thornton S (2003) The role of oxytocin in parturition. *BJOG* 110: 46–51.
- Bliss TV, Collingridge GL (1993) A synaptic model of memory: long-term potentiation in the hippocampus. *Nature*. 361: 31–39.
- Bliss TV, Lømo T (1973) Long-lasting potentiation of synaptic transmission in the dentate area of the anaesthetized rabbit following stimulation of the perforant path. *J Physiol* 232: 331–356.
- Bole-Feysot C, Goffin V, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998) Prolactin (PRL) and its receptor: actions, signal transduction pathways and phenotypes observed in PRL receptor knockout mice. *Endocr Rev* 19: 225–268.
- Bove R, Secor E, Chibnik LB, Barnes LL, Schneider JA, Bennett DA, De Jager PL (2014) Age at surgical menopause influences cognitive decline and Alzheimer pathology in older women. *Neurology*. 82: 222–229.
- Boutin JM, Jolicoeur C, Okamura H, Gagnon J, Edery M, Shirota M, Banville D, Dusanter-Fourt I, Djiane J, Kelly PA (1988) Cloning and expression of the rat prolactin receptor, a member of the growth hormone/prolactin receptor gene family. *Cell*. 53: 69–77.
- Bridges RS, DiBiase R, Loundes DD, Doherty PC (1985) Prolactin stimulation of maternal behavior in female rats. *Science*. 227: 782–784.
- Bridges RS, Numan M, Ronsheim PM, Mann PE, Lupini CE (1990) Central prolactin infusions stimulate maternal behavior in steroid-treated, nulliparous female rats. *Proc Natl Acad Sci U S A*. 87: 8003–8007.
- Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Friesen HG, Stuer AM, Mann PE (1996) Endocrine communication between conceptus and mother: placental lactogen stimulation of maternal behavior. *Neuroendocrinology*. 64: 57–64.
- Bridges RS, Robertson MC, Shiu RP, Sturgis JD, Henriquez BM, Mann PE (1997) Central lactogenic regulation of maternal behavior in rats: steroid dependence, hormone specificity, and behavioral potencies of rat prolactin and rat placental lactogen I. *Endocrinology*. 138: 756–763.
- Bridges RS, Ronsheim PM (1990) Prolactin (PRL) regulation of maternal behavior in rats: bromocriptine treatment delays and PRL promotes the rapid onset of behavior. *Endocrinology*. 126: 837–848.

- Brown RS, Herbison AE, Grattan DR (2011) Differential changes in responses of hypothalamic and brainstem neuronal populations to prolactin during lactation in the mouse. *Biol Reprod.* 84: 826–836.
- Brown RS, Piet R, Herbison AE, Grattan DR (2012) Differential actions of prolactin on electrical activity and intracellular signal transduction in hypothalamic neurons. *Endocrinology.* 153: 2375–2384.
- Brown RS, Herbison AE, Grattan DR (2014) Prolactin regulation of kisspeptin neurones in the mouse brain and its role in the lactation-induced suppression of kisspeptin expression. *J Neuroendocrinol.* 26: 898–908.
- Brown RS, Kokay IC, Herbison AE, Grattan DR (2010) Distribution of prolactin-responsive neurons in the mouse forebrain. *J Comp Neurol.* 518: 92–102.
- Brusco J, Wittmann R, de Azevedo MS, Lucion AB, Franci CR, Giovenardi M, Rasia-Filho AA (2008) Plasma hormonal profiles and dendritic spine density and morphology in the hippocampal CA1 stratum radiatum, evidenced by light microscopy, of virgin and postpartum female rats. *Neurosci Lett.* 438: 346–50.
- Buhl EH, Han ZS, Lörinczi Z, Stezhka VV, Karnup SV, Somogyi P (1994) Physiological properties of anatomically identified axo-axonic cells in the rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 71: 1289–1307.
- Buonfiglio DC, Ramos-Lobo AM, Silveira MA, Furigo IC, Hennighausen L, Frazão R, Donato J Jr (2015) Neuronal STAT5 signaling is required for maintaining lactation but not for postpartum maternal behaviors in mice. *Horm Behav.* 71: 60–68.
- Caligaris L, Astrada JJ, Taleisnik S (1974) Oestrogen and progesterone influence on the release of prolactin in ovariectomized rats. *J Endocrinol* 60: 205–215.
- Carroll JC, Rosario ER, Chang L, Stanczyk FZ, Oddo S, LaFerla FM, Pike CJ (2007) Progesterone and estrogen regulate Alzheimer-like neuropathology in female 3xTg-AD mice. *J Neurosci.* 27: 13357–13365.
- Carroll JC, Rosario ER, Villamagna A, Pike CJ (2010) Continuous and cyclic progesterone differentially interact with estradiol in the regulation of Alzheimer-like pathology in female 3xTransgenic-Alzheimer's disease mice. *Endocrinology.* 151: 2713–2722.
- Celikel T, Szostak VA, Feldman DE (2004) Modulation of spike timing by sensory deprivation during induction of cortical map plasticity. *Nat Neurosci.* 7:534–541.
- Chamley LW, Holland OJ, Chen Q, Viall CA, Stone PR, Abumaree M (2014) Review: where is the maternofetal interface? *Placenta.* 35 Suppl: S74–80. Review.

- Chiba T, Yamada M, Sasabe J, Terashita K, Shimoda M, Matsuoka M, Aiso S (2009) Amyloid-beta causes memory impairment by disturbing the JAK2/STAT3 axis in hippocampal neurons. *Mol Psychiatry*. 14: 206–222.
- Chongthammakun S, Terasawa E (1993) Negative feedback effects of estrogen on luteinizing hormone-releasing hormone release occur in pubertal, but not prepubertal, ovariectomized female rhesus monkeys. *Endocrinology*. 132: 735–743.
- Claiborne BJ, Amaral DG, Cowan WM (1986) A light and electron microscopic analysis of the mossy fibers of the rat dentate gyrus. *J Comp Neurol*. 246: 435–458.
- Clapp C, Torner L, Gutiérrez-Ospina G, Alcántara E, López-Gómez FJ, Nagano M, Kelly PA, Mejía S, Morales MA, Martínez de la Escalera G (1994) The prolactin gene is expressed in the hypothalamic-neurohypophyseal system and the protein is processed into a 14-kDa fragment with activity like 16-kDa prolactin. *Proc Natl Acad Sci U S A* 91: 10384–10388.
- Cole LA (2010) Biological functions of hCG and hCG-related molecules. *Reprod Biol Endocrinol*. 8: 102. doi: 10.1186/1477-7827-8-102. Review.
- Collingridge GL, Isaac JT, Wang YT (2004) Receptor trafficking and synaptic plasticity. *Nat Rev Neurosci*. 5: 952–962.
- Córdoba Montoya DA, Carrer HF (1997) Estrogen facilitates induction of long term potentiation in the hippocampus of awake rats. *Brain Res*. 778: 430–438.
- Craig MC, Murphy DG (2010) Estrogen therapy and Alzheimer's dementia. *Ann N Y Acad Sci*. 1205: 245–253.
- Crowley WF Jr, Filicori M, Spratt DI (1985) The physiology of gonadotropin-releasing hormone (GnRH) secretion in men and women. *Recent Prog Horm Res* 41: 473–531.
- Demarest KT, Duda NJ, Riegle GD, Moore KE (1983a) Placental lactogen mimics prolactin in activating tuberoinfundibular dopaminergic neurons. *Brain Res*. 272: 175–178.
- Demarest KT, McKay DW, Riegle GD, Moore KE (1983) Biochemical indices of tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity during lactation: a lack of response to prolactin. *Neuroendocrinology*. 36: 130–137.
- Demarest KT, Moore KE (1981) Sexual differences in the sensitivity of tuberoinfundibular dopamine neurons to the actions of prolactin, *Neuroendocrinology*, 33: 230–234.
- Das R, Vonderhaar BK (1995) Transduction of prolactin's (PRL) growth signal through both long and short forms of the PRL receptor. *Mol Endocrinol* 9: 1750–1759.
- DeLeon DD, Zelinski-Wooten MB, Barkley MS (1990) Hormonal basis of variation in oestrous cyclicity in selected strains of mice. *J Reprod Fertil*. 89: 117–126.

- DeMaria JE, Lerant AA, Freeman ME (1999) Prolactin activates all three populations of hypothalamic neuroendocrine dopaminergic neurons in ovariectomized rats. *Brain Res.* 837: 236–41.
- DeVito WJ, Okulicz WC, Stone S, Avakian C (1992) Prolactin-stimulated mitogenesis of cultured astrocytes. *Endocrinology.* 130: 2549–2556.
- Ducret T, Boudina S, Sorin B, Vacher AM, Gourdou I, Liguoro D, Guerin J, Bresson-Bepoldin L, Vacher P (2002) Effects of prolactin on intracellular calcium concentration and cell proliferation in human glioma cells. *Glia.* 38: 200–214.
- Durham RA, Johnson JD, Eaton MJ, Moore KE, Lookingland KJ (1998) Opposing roles for dopamine D1 and D2 receptors in the regulation of hypothalamic tuberoinfundibular dopamine neurons. *Eur J Pharmacol.* 355: 141–147.
- Eaton MJ, Gopalan C, Kim E, Lookingland KJ, Moore KE (1993) Comparison of the effects of the dopamine D₂ agonist quinolorane on tuberoinfundibular dopaminergic neuronal activity in male and female rats. *Brain Res.* 629: 53–58.
- Felman K, Tappaz M (1989) GABAergic biochemical parameters of the tuberoinfundibular neurons following chronic hyperprolactinemia. *Neuroendocrinology* 49: 580–585.
- Fernández de Sevilla D, Núñez A, Borde M, Malinow R, Buño W (2008) Cholinergic-mediated IP₃-receptor activation induces long-lasting synaptic enhancement in CA1 pyramidal neurons. *J Neurosci* 28: 1469–1478.
- Filicori M, Butler JP, Crowley WF Jr (1984) Neuroendocrine regulation of the corpus luteum in the human. Evidence for pulsatile progesterone secretion. *J Clin Invest.* 73: 1638–1647.
- Filicori M, Flamigni C, Vizzello G, Dalpiaz C, Ferrari P, Flaminia R, Santoro N, Crowley WF Jr (1986) Hypothalamic control of gonadotropin secretion in the human menstrual cycle. *Prog Clin Biol Res.* 225: 55–74. Review.
- Forsyth IA, Wallis M (2002) Growth hormone and prolactin--molecular and functional evolution. *J Mammary Gland Biol Neoplasia.* 7: 291–312.
- Foy M, Baudry M, Thompson R (2004) Estrogen and hippocampal synaptic plasticity. *Neuron Glia Biol.* 1: 327–338.
- Freeman ME, Kanyicska B, Lerant A, Nagy G (2000) Prolactin: structure, function, and regulation of secretion. *Physiol Rev* 80: 1523–1631.
- Fuchs AR, Romero R, Keefe D, Parra M, Oyarzun E, Behnke E (1991) Oxytocin secretion and human parturition: pulse frequency and duration increase during spontaneous labor in women. *Am J Obstet Gynecol.* 165: 1515–1523.

- Furigo IC, Kim KW, Nagaishi VS, Ramos-Lobo AM, de Alencar A, Pedroso JA, Metzger M, Donato J Jr (2014) Prolactin-sensitive neurons express estrogen receptor- α and depend on sex hormones for normal responsiveness to prolactin. *Brain Res.* 1566: 47–59.
- Gaiarsa JL, Caillard O, Ben-Ari Y (2002) Long-term plasticity at GABAergic and glycinergic synapses: mechanisms and functional significance. *Trends Neurosci.* 25: 564–570.
- García-Segura LM (2009) Hormones and Brain plasticity. In: *Oxford Series in Behavioral Neuroendocrinology*, edited by Ball GF, Balthazart J, Nelson RJ. Oxford University Press. New York, USA.
- Gay VL, Midgley AR Jr, Niswender GD (1970) Patterns of gonadotrophin secretion associated with ovulation. *Fed Proc.* 29: 1880–1887.
- Gill S, Sharpless JL, Rado K, Hall JE (2002) Evidence that GnRH decreases with gonadal steroid feedback but increases with age in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 87: 2290–2296.
- Goffin V, Bouchard B, Ormandy CJ, Weimann E, Ferrag F, Touraine P, Bole-Feysot C, Maaskant RA, Clement-Lacroix P, Edery M, Binart N, Kelly PA (1998) Prolactin: a hormone at the crossroads of neuroimmunoendocrinology. *Ann N Y Acad Sci* 840: 498–509.
- Golub MS, Germann SL, Mercer M, Gordon MN, Morgan DG, Mayer LP, Hoyer PB (2008) Behavioral consequences of ovarian atrophy and estrogen replacement in the APPswe mouse. *Neurobiol Aging.* 29: 1512–1523.
- Granado N, Ortiz O, Suárez LM, Martín ED, Ceña V, Solís JM, Moratalla R (2008) D1 but not D5 dopamine receptors are critical for LTP, spatial learning, and LTP-Induced arc and zif268 expression in the hippocampus. *Cereb Cortex.* 18: 1–12.
- Grattan DR (2002) Behavioural significance of prolactin signalling in the central nervous system during pregnancy and lactation. *Reproduction.* 123: 497-506. Review.
- Grattan DR, Averill RL (1990) Effect of ovarian steroids on a nocturnal surge of prolactin secretion that precedes parturition in the rat. *Endocrinology.* 126: 1199–1205.
- Grattan DR, Kokay IC (2008) Prolactin: a pleiotropic neuroendocrine hormone. *J Neuroendocrinol* 20: 752–763.
- Grattan DR, Steyn FJ, Kokay IC, Anderson GM, Bunn SJ (2008) Pregnancy-induced adaptation in the neuroendocrine control of prolactin secretion. *J Neuroendocrinol.* 20: 497–507. Review.
- Gregg C, Shikar V, Larsen P, Mak G, Chojnacki A, Yong VW, Weiss S (2007) White matter plasticity and enhanced remyelination in the maternal CNS. *J Neurosci* 27: 1812–1823.

- Green PS, Bales K, Paul S, Bu G (2005) Estrogen therapy fails to alter amyloid deposition in the PDAPP model of Alzheimer's disease. *Endocrinology*. 146: 2774–2781.
- Gruart A, Sánchez-Campusano R, Fernández-Guizán A, Delgado-García JM (2015) A Differential and Timed Contribution of Identified Hippocampal Synapses to Associative Learning in Mice. *Cereb Cortex*. 25: 2542–2555.
- Guillou A, Romanò N, Steyn F, Abitbol K, Le Tissier P, Bonnefont X, Chen C, Mollard P, Martin AO (2015) Assessment of lactotroph axis functionality in mice: longitudinal monitoring of PRL secretion by ultrasensitive-ELISA. *Endocrinology*. 156: 1924–1930.
- Gureviciene I, Puoliväli J, Pussinen R, Wang J, Tanila H, Ylinen A (2003) Estrogen treatment alleviates NMDA-antagonist induced hippocampal LTP blockade and cognitive deficits in ovariectomized mice. *Neurobiol Learn Mem*. 79: 72–80.
- Hall JE, Whitcomb RW, Rivier JE, Vale WW, Crowley WF Jr (1990) Differential regulation of luteinizing hormone, follicle-stimulating hormone, and free alpha-subunit secretion from the gonadotrope by gonadotropin-releasing hormone (GnRH): evidence from the use of two GnRH antagonists. *J Clin Endocrinol Metab*. 70: 328–335.
- Halmi NS, Parsons JA, Erlandsen SL, Duello T (1975) Prolactin and growth hormone cells in the human hypophysis: a study with immunoenzyme histochemistry and differential staining. *Cell Tissue Res*. 158: 497–507.
- Han ZS, Buhl EH, Lörinczi Z, Somogyi P (1993) A high degree of spatial selectivity in the axonal and dendritic domains of physiologically identified local-circuit neurons in the dentate gyrus of the rat hippocampus. *Eur J Neurosci*. 5: 395–410.
- Handwerger S (1991) Clinical counterpoint: the physiology of placental lactogen in human pregnancy. *Endocr Rev*. 12: 329–336.
- Handwerger S, Freemark M (2000) The roles of placental growth hormone and placental lactogen in the regulation of human fetal growth and development. *J Pediatr Endocrinol Metab*. 13: 343–356. Review.
- Harris EW, Cotman CW (1986) Long-term potentiation of guinea pig mossy fiber responses is not blocked by N-methyl D-aspartate antagonists. *Neurosci Lett* 70: 132–137.
- Harris GW, Pickles VR (1953) Reflex stimulation of the neurohypophysis (posterior pituitary gland) and the nature of posterior pituitary hormone(s). *Nature* 172: 1049.
- Hawkins SM, Matzuk MM (2008) The menstrual cycle: basic biology. *Ann N Y Acad Sci*. 1135: 10–8. doi: 10.1196/annals.1429.018.

- Heikkinen T, Kalesnykas G, Rissanen A, Tapiola T, Iivonen S, Wang J, Chaudhuri J, Tanila H, Miettinen R, Puoliväli J (2004) Estrogen treatment improves spatial learning in APP + PS1 mice but does not affect beta amyloid accumulation and plaque formation. *Exp Neurol.* 187: 105–117.
- Hernandez A, Tan C, Mettlach G, Pozo K, Plattner F, Bibb JA (2016) Cdk5 Modulates Long-Term Synaptic Plasticity and Motor Learning in Dorsolateral Striatum. *Sci Rep.* 6: 29812. doi: 10.1038/srep29812.
- Hu ZZ, Zhuang L, Dufau ML (1998) Prolactin receptor gene diversity: structure and regulation. *Trends Endocrinol Metab.* 9: 94–102.
- Huang YY, Malenka RC (1993) Examination of TEA-induced synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus: the role of voltage-dependent Ca^{2+} channels in the induction of LTP. *J Neurosci* 13: 568–576.
- Imagawa W, Yang J., Guzman R, Nandi S (1994) Control of mammary gland development. in: E. Knobil, J.D. Neill (Eds.) *The Physiology of Reproduction*. 2nd ed. Raven Press, Ltd, New York, NY; 1033–1063.
- Jabbour HN, Critchley HO (2001) Potential roles of decidual prolactin in early pregnancy. *Reproduction.* 121: 197–205. Review.
- Jabbour HN, Critchley HO, Boddy SC (1998) Expression of functional prolactin receptors in nonpregnant human endometrium: Janus kinase-2, signal transducer and activator of transcription-1 (STAT1), and STAT5 proteins are phosphorylated after stimulation with prolactin. *J Clin Endocrinol Metab* 83: 2545–2553.
- Jayaraman A, Carroll JC, Morgan TE, Lin S, Zhao L, Arimoto JM, Murphy MP, Beckett TL, Finch CE, Brinton RD, Pike CJ (2012) 17β -estradiol and progesterone regulate expression of β -amyloid clearance factors in primary neuron cultures and female rat brain. *Endocrinology.* 153: 5467–5479.
- Kaiser UB (1998) Molecular mechanisms of the regulation of gonadotropin gene expression by gonadotropin-releasing hormone. *Mol Cells.* 8: 647–656. Review.
- Kanasaki H, Oride A, Mijiddorj T, Kyo S (2015) Role of thyrotropin-releasing hormone in prolactin-producing cell models. *Neuropeptides.* 54: 73–77. Review.
- Kanterewicz BI, Urban NN, McMahon DB, Norman ED, Giffen LJ, Favata MF, Scherle PA, Trzskos JM, Barrionuevo G, Klann E (2000) The extracellular signal-regulated kinase cascade is required for NMDA receptor-independent LTP in area CA1 but not area CA3 of the hippocampus. *J Neurosci.* 20: 3057–3123.

- Keye Jr WR, Jaffe RB (1976) Changing patterns of FSH and LH responses to gonadotropin-releasing hormone in the puerperium. *J Clin Endocrinol Metab.* 42: 1133–1138.
- Kinsley CH, Trainer R, Stafisso-Sandoz G, Quadros P, Marcus LK, Hearon C, Meyer EA, Hester N, Morgan M, Kozub FJ, Lambert KG (2006) Motherhood and the hormones of pregnancy modify concentrations of hippocampal neuronal dendritic spines. *Horm Behav.* 49: 131–42.
- Kokay IC, Bull PM, Davis RL, Ludwig M, Grattan DR (2006) Expression of the long form of the prolactin receptor in magnocellular oxytocin neurons is associated with specific prolactin regulation of oxytocin neurons. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol* 290: R1216–R1225.
- Kokay IC, Petersen SL, Grattan DR (2011) Identification of prolactin-sensitive GABA and kisspeptin neurons in regions of the rat hypothalamus involved in the control of fertility. *Endocrinology.* 152: 526–35.
- Knobil E (1980) The neuroendocrine control of the menstrual cycle. *Recent Prog Horm Res.* 36:53–88. Review.
- Kornblatt JJ, Grattan DR (2001) Lactation alters -aminobutyric acid neuronal activity in the hypothalamus and cerebral cortex in the rat. *Neuroendocrinology* 73: 175–184.
- Kunkel DD, Lacaille JC, Schwartzkroin PA (1988) Ultrastructure of stratum lacunosum-moleculare interneurons of hippocampal CA1 region. *Synapse.* 2: 382–394.
- Larsen CM, Grattan DR (2010) Prolactin-induced mitogenesis in the subventricular zone of the maternal brain during early pregnancy is essential for normal postpartum behavioral responses in the mother. *Endocrinology.* 151: 3805–3814.
- *Lao-Peregrín C, *Ballesteros JJ, *Fernández M, ***Zamora-Moratalla A**, Saavedra A, Gómez Lázaro M, Pérez-Navarro E, Burks D, Martín ED (2016) Caffeine-mediated BDNF release regulates long-term synaptic plasticity through activation of IRS2 signaling. *Addict Biol.* doi: 10.1111/adb.12433. *co-primeros autores.
- Lee CK, Kang HS, Lee BJ, Kang HM, Choi WS, Kang SG (1999) Effects of dopamine and melatonin on the regulation of the PIT-1 isotype, placental growth hormone and lactogen gene expressions in the rat placenta. *Mol Cells.* 9: 646–51.
- Levin-Allerhand JA, Lominska CE, Wang J, Smith JD (2002) 17Alpha-estradiol and 17beta-estradiol treatments are effective in lowering cerebral amyloid-beta levels in AbetaPPSWE transgenic mice. *J Alzheimers Dis.* 4: 449–457.

- Li C, Rainnie DG (2014) Bidirectional regulation of synaptic plasticity in the basolateral amygdala induced by the D1-like family of dopamine receptors and group II metabotropic glutamate receptors. *J Physiol.* 592: 4329–4351.
- Li C, Brake WG, Romeo RD, Dunlop JC, Gordon M, Buzescu R, Magarinos AM, Allen PB, Greengard P, Luine V, McEwen BS (2004) Estrogen alters hippocampal dendritic spine shape and enhances synaptic protein immunoreactivity and spatial memory in female mice. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 101: 2185–2190.
- Li XG, Somogyi P, Ylinen A, Buzsáki G (1994) The hippocampal CA3 network: an in vivo intracellular labeling study. *J Comp Neurol.* 339: 181–208.
- Liu F, Day M, Muñiz LC, Bitran D, Arias R, Revilla-Sanchez R, Grauer S, Zhang G, Kelley C, Pulito V, Sung A, Mervis RF, Navarra R, Hirst WD, Reinhart PH, Marquis KL, Moss SJ, Pangalos MN, Brandon NJ (2008) Activation of estrogen receptor-beta regulates hippocampal synaptic plasticity and improves memory. *Nat Neurosci.* 11: 334–343.
- Liu SQ, Cull-Candy, SG (2000) Synaptic activity at calciumpermeable AMPA receptors induces a switch in receptor subtype. *Nature.* 405: 454–458.
- Lorente de Nó R (1934) Studies of the structure of the cerebral cortex. II. Continuation of the study of the ammonic system. *J. Psychol. Neurol.* 46: 113–177.
- Lucas BK, Ormandy CJ, Binart N, Bridges RS, Kelly PA (1998) Null mutation of the prolactin receptor gene produces a defect in maternal behavior. *Endocrinology.* 139: 4102–4107.
- Lynch MA (2004) Long-term potentiation and memory. *Physiol Rev* 84: 87–136.
- Lyons DJ, Hellysaz A, Broberger C (2012) Prolactin regulates tuberoinfundibular dopamine neuron discharge pattern: novel feedback control mechanisms in the lactotrophic axis. *J Neurosci.* 32: 8074–8083.
- Magni P, Dozio E, Ruscica M, Watanobe H, Cariboni A, Zaninetti R, Motta M, Maggi R (2007) Leukemia inhibitory factor induces the chemomigration of immortalized gonadotropin-releasing hormone neurons through the independent activation of the Janus kinase/signal transducer and activator of transcription 3, mitogen-activated protein kinase/extracellularly regulated kinase 1/2, and phosphatidylinositol 3-kinase/Akt signaling pathways. *Mol Endocrinol.* 21: 1163–1174.
- Maguire J, Ferando I, Simonsen C, Mody I (2009) Excitability changes related to GABA_A receptor plasticity during pregnancy. *J Neurosci.* 29: 9592–9601.
- Mahmoud GS, Grover LM (2006) Growth hormone enhances excitatory synaptic transmission in area CA1 of rat hippocampus. *J Neurophysiol.* 95: 2962–2974.

- Mak GK, Enwere EK, Gregg C, Pakarainen T, Poutanen M, Huhtaniemi I, Weiss S (2007) Male pheromone-stimulated neurogenesis in the adult female brain: possible role in mating behavior. *Nat Neurosci* 10: 1003–1011.
- Mak G, Weiss S (2010) Paternal recognition of adult offspring mediated by newly generated CNS neurons. *Nat Neurosci* 13: 753–758.
- Malenka RC (1991) Postsynaptic factors control the duration of synaptic enhancement in area CA1 of the hippocampus. *Neuron* 6: 53–60.
- Malenka RC, Nicoll RA (1993) NMDA-receptor-dependent synaptic plasticity: multiple forms and mechanisms. *Trends Neurosci* 16: 521–527.
- Mangurian LP, Walsh RJ, Posner BI (1992) Prolactin enhancement of its own uptake at the choroid plexus. *Endocrinology* 131: 698–702.
- Mansour A, Meador-Woodruff JH, Bunzow JR, Civelli O, Akil H, Watson SJ (1990) Localization of dopamine D2 receptor mRNA and D1 and D2 receptor binding in the rat brain and pituitary: an in situ hybridization-receptor autoradiographic analysis. *J Neurosci*. 10: 2587–2600.
- Markram H, Lübke J, Frotscher M, Sakmann B (1997) Regulation of synaptic efficacy by coincidence of postsynaptic APs and EPSPs. *Science*. 275: 213–215.
- Marshall JC, Griffin ML (1993) The role of changing pulse frequency in the regulation of ovulation. *Hum Reprod. Suppl* 2: 57–61. Review
- Martín ED, Araque A, Buño W (2001) Synaptic regulation of the slow Ca^{2+} -activated K^{+} current in hippocampal CA1 pyramidal neurons: implication in epileptogenesis. *J Neurophysiol*. 86: 2878–2886.
- Martín ED, Buño W (2003) Caffeine-mediated presynaptic long-term potentiation in hippocampal CA1 pyramidal neurons. *J Neurophysiol*. 89: 3029–3038.
- Martín ED, Buño W (2005) Stabilizing effects of extracellular ATP on synaptic efficacy and plasticity in hippocampal pyramidal neurons. *Eur J Neurosci*. 21: 936–944.
- McLean AC, Valenzuela N, Fai S, Bennett SA (2012) Performing vaginal lavage, crystal violet staining, and vaginal cytological evaluation for mouse estrous cycle staging identification. *J Vis Exp*. 15: e4389. doi: 10.3791/4389.
- McNeilly AS (2001) Lactational control of reproduction. *Reprod Fertil Dev*. 13: 583–590. Review.
- Meister B, Hokfelt T, Geffard M, Ertel WO (1988) Glutamic acid decarboxylase- and gamma-aminobutyric acid-like immunoreactivities in corticotropin-releasing factor-containing

- parvocellular neurons of the hypothalamic paraventricular nucleus. *Neuroendocrinology* 48: 516–526.
- Mesiano S, Chan E-C, Fitter JT, Kwek K, Yeo G, Smith R (2002) Progesterone withdrawal and estrogen activation in human parturition are coordinated by progesterone receptor A expression in the myometrium. *J Clin Endocrinol Metab* 87: 2924–2930.
- Michael SD, Kaplan SB, Macmillan BT (1980) Peripheral plasma concentrations of LH, FSH, prolactin and GH from birth to puberty in male and female mice. *J Reprod Fertil.* 59: 217–222.
- Monaghan DT, Cotman CW (1982) The distribution of [3H] kainic acid binding sites in rat CNS as determined by autoradiography. *Brain Res.* 252: 91–100.
- Morales T, Lorensen M, Walker AM, Ramos E (2014) Both prolactin (PRL) and a molecular mimic of phosphorylated PRL, S179D-PRL, protect the hippocampus of female rats against excitotoxicity. *Neuroscience* 258: 211–217.
- Muccioli G, Di Carlo R (1994) Modulation of prolactin receptors in the rat hypothalamus in response to changes in serum concentration of endogenous prolactin or to ovine prolactin administration. *Brain Res.* 663: 244–250.
- Muttukrishna S, Fowler PA, George L (1996) Changes in peripheral serum levels of total activin A during the human menstrual cycle and pregnancy. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3328–3334.
- Nagy GM, Bodnár I, Bánky Z, Halász B (2005) Control of prolactin secretion by excitatory amino acids. *Endocrine.* 28: 303–308.
- Nakai Y, Plant TM, Hess DL, Keogh EJ, Knobil E (1978) On the sites of the negative and positive feedback actions of estradiol in the control of gonadotropin secretion in the rhesus monkey. *Endocrinology.* 102: 1008–1014.
- Navarrete M, Perea G, Fernandez de Sevilla D, Gómez-Gonzalo M, Núñez A, Martín ED, Araque A (2012) Astrocytes mediate in vivo cholinergic-induced synaptic plasticity. *PLoS Biol.* 10:e1001259. doi: 10.1371/journal.pbio.1001259.
- Neill JD (1970) Effect of "stress" on serum prolactin and luteinizing hormone levels during the estrous cycle of the rat. *Endocrinology.* 87: 1192–1197.
- Neill JD, Nagy GM (1994) Prolactin secretion and its control. In: *The Physiology of Reproduction*, edited by Knobil E and Neill JD. New York: Raven, p. 1833–1860.
- Nicolas CS, Amici M, Bortolotto ZA, Doherty A, Csaba Z, Fafouri A, Dournaud P, Gressens P, Collingridge GL, Peineau S (2013) The role of JAK-STAT signaling within the CNS. *JAKSTAT.* 2: e22925. doi: 10.4161/jkst.22925. Review.

- Nicolas CS, Peineau S, Amici M, Csaba Z, Fafouri A, Javalet C, Collett VJ, Hildebrandt L, Seaton G, Choi SL, Sim SE, Bradley C, Lee K, Zhuo M, Kaang BK, Gressens P, Dournaud P, Fitzjohn SM, Bortolotto ZA, Cho K, Collingridge GL (2012) The Jak/STAT pathway is involved in synaptic plasticity. *Neuron*. 73: 374–390.
- Nicholson G, Greeley GH Jr, Humm J, Youngblood WW, Kizer JS (1980) Prolactin in cerebrospinal fluid: a probable site of prolactin autoregulation. *Brain Res*. 190: 447–457.
- Nippoldt TB, Reame NE, Kelch RP (1989) The roles of estradiol and progesterone in decreasing luteinizing hormone pulse frequency in the luteal phase of the menstrual cycle. *J Clin Endocrinol Metab* 69: 67–76.
- Noel GL, Dimond RC, Wartofsky L, Earll JM, Frantz AG (1974) Studies of prolactin and TSH secretion by continuous infusion of small amounts of thyrotropin-releasing hormone (TRH). *J Clin Endocrinol Metab*. 39: 6–17.
- Nogami H, Hoshino R, Ogasawara K, Miyamoto S, Hisano S (2007) Region-specific expression and hormonal regulation of the first exon variants of rat prolactin receptor mRNA in rat brain and anterior pituitary gland. *J Neuroendocrinol*. 19: 583–593.
- Ottowitz WE, Dougherty DD, Fischman A (2008) [18F] 2-fluoro-2-deoxy-D-glucose positron emission tomography demonstration of estrogen negative and positive feedback on luteinizing hormone secretion in women. *J Clin Endocrinol Metab* 93: 3208–3214.
- Palm R, Chang J, Blair J, Garcia-Mesa Y, Lee HG, Castellani RJ, Smith MA, Zhu X, Casadesus G (2014) Down-regulation of serum gonadotropins but not estrogen replacement improves cognition in aged-ovariectomized 3xTg AD female mice. *J Neurochem*. 30: 115-125.
- Palmer MJ, Isaac JT, Collingridge GL (2004) Multiple developmentally regulated expression mechanisms of long term potentiation at CA1 synapses. *J. Neurosci*. 24: 4903–4911.
- Pan JT, Mai LM (1990) Dopamine antagonism does not potentiate the effects of oxytocin and vasopressin on prolactin secretion. *Life Sci* 47: 2443–2450.
- Patil MJ, Henry MA, Akopian AN (2014) Prolactin receptor in regulation of neuronal excitability and channels. *Channels*. 8:193–202.
- Perez-Alvarez A, Navarrete M, Covelo A, Martin ED, Araque A (2014). *J Neurosci* 34: 12738–12744.
- Petanceska SS, Nagy V, Frail D, Gandy S (2000) Ovariectomy and 17beta-estradiol modulate the levels of Alzheimer's amyloid beta peptides in brain. *Exp Gerontol*. 35: 1317–1325.

- Pfleger KD, Kroeger KM, Eidne KA (2004) Receptors for hypothalamic releasing hormones TRH and GnRH: oligomerization and interactions with intracellular proteins. *Semin Cell Dev Biol* 15: 269–280.
- Phan A, Gabor CS, Favaro KJ, Kaschack S, Armstrong JN, MacLusky NJ, Choleris E (2012) Low doses of 17 β -estradiol rapidly improve learning and increase hippocampal dendritic spines. *Neuropsychopharmacology*. 37: 2299–2309.
- Pi XJ, Grattan DR (1998) Distribution of prolactin receptor immunoreactivity in the brain of estrogen-treated, ovariectomized rats. *J Comp Neurol*. 394: 462–474.
- Pi XJ, Grattan DR (1999) Increased prolactin receptor immunoreactivity in the hypothalamus of lactating rats. *J Neuroendocrinol*. 11: 693–705. Erratum in: *J Neuroendocrinol* 2000 12: 97–98.
- Pi X, Voogt JL (2001) Mechanisms for suckling-induced changes in expression of prolactin receptor in the hypothalamus of the lactating rat. *Brain Res*. 891: 197–205.
- Plant TM, Marshall GR (2001) The functional significance of FSH in spermatogenesis and the control of its secretion in male primates. *Endocr Rev*. 22: 764–786.
- Puighermanal E, Cutando L, Boubaker-Vitre J, Honoré E, Longueville S, Hervé D, Valjent E (2016) Anatomical and molecular characterization of dopamine D1 receptor-expressing neurons of the mouse CA1 dorsal hippocampus. *Brain Struct Funct*. doi: 10.1007/s00429-016-1314-x.
- Qureshi GA, Hansen S, Södersten P (1987) Offspring control of cerebrospinal fluid GABA concentrations in lactating rats. *Neurosci Lett* 75: 85–88.
- Rabeler R, Mittag J, Geffers L, Ruther U, Leitges M, Parlow AF, Visser TJ, Bauer K (2004) Generation of thyrotropin-releasing hormone receptor 1-deficient mice as an animal model of central hypothyroidism. *Mol Endocrinol* 18: 1450–1460.
- Radl DB, Zárate S, Jaita G, Ferraris J, Zaldivar V, Eijo G, Seilicovich A, Pisera D (2008) Apoptosis of lactotrophs induced by D₂ receptor activation is estrogen dependent. *Neuroendocrinology*. 88: 43–52.
- Ramón y Cajal S (1894) The Croonian lectura: La fine structure desc centres nerveux. *Proc Roy Soc London* 55: 444–467.
- Ramón y Cajal, S (1911) *Histologie du Système Nerveux de l'Homme et des Vertébrés*. A. Maloine, Paris. English translation by N. Swanson and L.W. Swanson, *Histology of the Nervous System*, Vol. 2. Oxford University Press, New York, Oxford, 1995.
- Ratner LD, Gonzalez B, Ahtaiainen P, Di Giorgio NP, Poutanen M, Calandra RS, Huhtaniemi IT, Rulli SB (2012) Short-term pharmacological suppression of the hyperprolactinemia of

- infertile hCG-overproducing female mice persistently restores their fertility. *Endocrinology*. 153: 5980–5992.
- Recouvreur MV, Guida MC, Rifkin DB, Becu-Villalobos D, Díaz-Torga G (2011) Active and total transforming growth factor- β 1 are differentially regulated by dopamine and estradiol in the pituitary. *Endocrinology*. 152: 2722–2730.
- Reame N, Sauder SE, Kelch RP, Marshall JC (1984) Pulsatile gonadotropin secretion during the human menstrual cycle: evidence for altered frequency of gonadotropin-releasing hormone secretion. *J Clin Endocrinol Metab* 59: 328–337.
- Redzic ZB, Preston JE, Duncan JA, Chodobski A, Szmydynger-Chodobska J (2005) The choroid plexus–cerebrospinal fluid system: from development to aging. *Curr Top Dev Biol*; 71: 1–52.
- Reymond MJ, Porter JC (1985) Involvement of hypothalamic dopamine in the regulation of prolactin secretion. *Horm Res*. 22: 142–52. Review.
- Richard P, Moos F, Freund-Mercier MJ (1991) Central effects of oxytocin. *Physiological Reviews*. 71: 331–370.
- Riddick DH, Luciano AA, Kusmik WF, Maslar IA (1978) *De novo* synthesis of prolactin by human decidua. *Life Sci*. 23: 1913–1921.
- Romanò N, Yip SH, Hodson DJ, Guillou A, Parnaudeau S, Kirk S, Tronche F, Bonnefont X, Le Tissier P, Bunn SJ, Grattan DR, Mollard P, Martin AO (2013) Plasticity of hypothalamic dopamine neurons during lactation results in dissociation of electrical activity and release. *J Neurosci*. 33: 4424–4433.
- Russell JA, Leng G, Douglas AJ (2003) The magnocellular oxytocin system, the fount of maternity: adaptations in pregnancy. *Frontiers in Neuroendocrinology* 24: 27–61.
- Samson WK, Schell DA (1995) Oxytocin and the anterior pituitary gland. *Adv Exp Med Biol*. 395: 355–364. Review.
- Sanna E, Mostallino MC, Murru L, Carta M, Talani G, Zucca S, Mura ML, Maciocco E, Biggio G (2009) Changes in expression and function of extrasynaptic GABA_A receptors in the rat hippocampus during pregnancy and after delivery. *J Neurosci*. 29: 1755–1765.
- Schally AV, Bowers CY (1964) Purification of luteinizing hormone-releasing factor from bovine hypothalamus. *Endocrinology*. 75: 608–614.
- Scharfman HE (1995) Electrophysiological evidence that dentate hilar mossy cells innervate both granule cells and interneurons. *J Neurophysiol*. 74: 179–194.

- Seress L (1988) Interspecies comparison of the hippocampal formation shows increased emphasis on the regio superior in the Ammon's horn of the human brain. *J Hirnforsch.* 29: 335–340.
- Serri O, Chik CL, Ur E, Ezzat S (2003) Diagnosis and management of hyperprolactinemia. *CMAJ.* 169: 575–581. Review.
- Shamgochian MD, Avakian C, Truong NH, Stone S, Tang KT, DeVito WJ (1995) Regulation of prolactin receptor expression by estradiol in the female rat brain. *Neuroreport.* 6: 2537–2541.
- Sharpless JL, Supko JG, Martin KA, Hall JE (1999) Disappearance of endogenous luteinizing hormone is prolonged in postmenopausal women. *J Clin Endocrinol Metab.* 84: 688–694.
- Shaw ND, Histed SN, Srouji SS, Yang J, Lee H, Hall JE (2010) Estrogen negative feedback on gonadotropin secretion: evidence for a direct pituitary effect in women. *J Clin Endocrinol Metab.* 4: 1955–1961.
- Shen H, Sabaliauskas N, Sherpa A, Fenton AA, Stelzer A, Aoki C, Smith SS (2010) A critical role for alpha4betadelta GABAA receptors in shaping learning deficits at puberty in mice. *Science.* 327: 1515–1518.
- Shingo T, Gregg C, Enwere E, Fujikawa H, Hassam R, Geary C, Cross JC, Weiss S (2003) Pregnancy-stimulated neurogenesis in the adult female forebrain mediated by prolactin. *Science* 299: 117–120.
- Soares MJ (2004) The prolactin and growth hormone families: pregnancy-specific hormones/cytokines at the maternal-fetal interface. *Reprod Biol Endocrinol.* 2: 51. Review.
- Soderlin TR, Derkach VA (2000) Postsynaptic protein phosphorylation and LTP. *Trends in Neuroscience* 23: 75–80.
- Song S, Miller KD, Abbott LF (2000) Competitive Hebbian learning through spike-timing-dependent synaptic plasticity. *Nat Neurosci.* 3: 919–926.
- Soriano E, Frotscher M (1989) A GABAergic axo-axonic cell in the fascia dentata controls the main excitatory hippocampal pathway. *Brain Res.* 503: 170–174.
- Soriano E, Nitsch R, Frotscher M (1990) Axo-axonic chandelier cells in the rat fascia dentata: Golgi-electron microscopy and immunocytochemical studies. *J Comp Neurol.* 293: 1–25.
- Soriano E, Frotscher M (1994) Mossy cells of the rat fascia dentata are glutamate-immunoreactive. *Hippocampus.* 4: 65–69.
- Soules MR, Steiner RA, Clifton DK, Cohen NL, Aksel S, Bremner WJ (1984) Progesterone modulation of pulsatile luteinizing hormone secretion in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 58: 378–383.

- Stojilkovic SS, Reinhart J, Catt KJ (1994) Gonadotropin-releasing hormone receptors: structure and signal transduction pathways. *Endocr Rev.* 15: 462–499. Review.
- Stouffer RL (2003) Progesterone as a mediator of gonadotrophin action in the corpus luteum: beyond steroidogenesis. *Hum Reprod Update.* 9: 99–117. Review.
- Swant J, Chirwa S, Stanwood G, Khoshbouei H (2010) Methamphetamine reduces LTP and increases baseline synaptic transmission in the CA1 region of mouse hippocampus. *PLoS One.* 5: e11382. doi: 10.1371/journal.pone.0011382.
- Talamantes F, Ogren L (1988) The placenta as an endocrine organ: polypeptides. In: Knobil E, Neill J, editors. *The physiology of reproduction*. New York: Raven Press, Ltd. p. 2093–2137.
- Tashjian AH Jr, Barowsky NJ, Jensen DK (1971) Thyrotropin releasing hormone: direct evidence for stimulation of prolactin production by pituitary cells in culture. *Biochem Biophys Res Commun.* 43: 516–523.
- Taylor AE, Whitney H, Hall JE (1995) Midcycle levels of sex steroids are sufficient to recreate the follicle-stimulating hormone but not the luteinizing hormone midcycle surge: evidence for the contribution of other ovarian factors to the surge in normal women. *J Clin Endocrinol Metab* 80: 1541–1547.
- Tejadilla D, Cerbón M, Morales T (2010) Prolactin reduces the damaging effects of excitotoxicity in the dorsal hippocampus of the female rat independently of ovarian hormones. *Neuroscience* 169: 1178–1185.
- Terasawa E, Timiras PS (1968) Electrical activity during the estrous cycle of the rat: cyclic changes in limbic structures. *Endocrinology.* 83: 207–216.
- Theodosis DT, Paut L, Tappaz ML (1986) Immunocytochemical analysis of the GABAergic innervation of oxytocin- and vasopressin secreting neurons in the rat supraoptic nucleus. *Neuroscience* 19: 207–222.
- Ting JT, Daigle TL, Chen Q, Feng G (2014) Acute brain slice methods for adult and aging animals: application of targeted patch clamp analysis and optogenetics. *Methods Mol Biol.* 1183: 221–242.
- Tomizawa K, Iga N, Lu YF, Moriwaki A, Matsushita M, Li ST, Miyamoto O, Itano T, Matsui H (2003) Oxytocin improves long-lasting spatial memory during motherhood through MAP kinase cascade. *Nat Neurosci.* 6: 384–390.
- Toni R, Lechan RM (1993) Neuroendocrine regulation of thyrotropin-releasing hormone (TRH) in the tuberoinfundibular system. *J Endocrinol Invest.* 16: 715–53.

- Torner L, Karg S, Blume A, Kandasamy M, Kuhn HG, Winkler J, Aigner L, Neumann ID (2009) Prolactin prevents chronic stress-induced decrease of adult hippocampal neurogenesis and promotes neuronal fate. *J Neurosci.* 29: 1826–1833.
- Torner L, Maloumby R, Nava G, Aranda J, Clapp C, Neumann ID (2004) In vivo release and gene upregulation of brain prolactin in response to physiological stimuli. *Eur J Neurosci* 19: 1601–1608.
- Torner L, Mejía S, López-Gómez FJ, Quintanar A, Martínez de la Escalera G, Clapp C (1995) A 14-kilodalton prolactin-like fragment is secreted by the hypothalamo-neurohypophyseal system of the rat. *Endocrinology* 136: 5454–5460.
- Torner L, Toschi N, Pohlinger A, Landgraf R, Neumann ID (2001) Anxiolytic and anti-stress effects of brain prolactin: improved efficacy of antisense targeting of the prolactin receptor by molecular modeling. *J Neurosci* 21: 3207–3214.
- Treloar AE, Boynton RE, Behn BG, Brown BW (1967) Variation of the human menstrual cycle through reproductive life. *Int J Fertil* 12: 77–126.
- Urano A, Ando H (2011) Diversity of the hypothalamo-neurohypophysial system and its hormonal genes, *Gen. Comp. Endocrinol.* 170: 41–56.
- Van Groen T, Wyss JM (1990) Extrinsic projections from area CA1 of the rat hippocampus: olfactory, cortical, subcortical, and bilateral hippocampal formation projections. *J Comp Neurol.* 302: 515–528.
- Walker TL, Vukovic J, Koudijs MM, Blackmore DG, Mackay EW, Sykes AM, Overall RW, Hamlin AS, Bartlett PF (2012) Prolactin stimulates precursor cells in the adult mouse hippocampus. *PLoS One* 7: e44371. doi: 10.1371/journal.pone.0044371.
- Walsh RJ, Slaby FJ, Posner BI (1987) A receptor-mediated mechanism for the transport of prolactin from blood to cerebrospinal fluid. *Endocrinology* 120: 1846–1850.
- Walters CA, Daly DC, Chapitis J, Kuslis ST, Prior JC, Kusmik WF, Riddick DH (1983) Human myometrium: a new potential source of prolactin. *Am J Obstet Gynecol* 147: 639–644.
- Warren SG, Humphreys AG, Juraska JM, Greenough WT (1995) LTP varies across the estrous cycle: enhanced synaptic plasticity in proestrus rats. *Brain Res.* 703: 26–30.
- Wersinger SR, Haisenleder DJ, Lubahn DB, Rissman EF (1999) Steroid feedback on gonadotropin release and pituitary gonadotropin subunit mRNA in mice lacking a functional estrogen receptor alpha. *Endocrine.* 11: 137–143.
- Wong M, Moss RL (1992) Long-term and short-term electrophysiological effects of estrogen on the synaptic properties of hippocampal CA1 neurons. *J Neurosci.* 12: 3217–3225.

- Wu S, Divall S, Hoffman GE, Le WW, Wagner KU, Wolfe A (2011) Jak2 is necessary for neuroendocrine control of female reproduction. *J Neurosci.* 31: 184–192. doi: 10.1523/JNEUROSCI.2974-10.2011.
- Wu W, Coss D, Lorensen MY, Kuo CB, Xu X, Walker AM (2003) Different biological effects of unmodified prolactin and a molecular mimic of phosphorylated prolactin involve different signaling pathways. *Biochemistry* 42: 7561–7570.
- Yeckel MF, Berger TW (1990) Feedforward excitation of the hippocampus by afferents from the entorhinal cortex: redefinition of the role of the trisynaptic pathway. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 87: 5832–5836.
- Zalutsky RA, Nicoll RA (1990) Comparison of two forms of long-term potentiation in single hippocampal neurons. *Science* 248: 1619–1624.
- Zelena D, Makara GB, Nagy GM (2003) Effect of glutamate receptor antagonists on suckling-induced prolactin release in rats. *Endocrine.* 21: 147–52.
- Zelevnik AJ, Plant TM (2015) Control of the Menstrual Cycle. In: Plant, TM.; Zelevnik, AJ., editors. *Knobil and Neill's Physiology of Reproduction.* 4. San Diego, CA, USA: Elsevier Inc; 2015. p. 1307–1361.
- Zhao L, Yao J, Mao Z, Chen S, Wang Y, Brinton RD (2011) 17 β -Estradiol regulates insulin-degrading enzyme expression via an ER β /PI3-K pathway in hippocampus: relevance to Alzheimer's prevention. *Neurobiol Aging.* 32: 1949–1963.
- Zheng H, Xu H, Uljon SN, Gross R, Hardy K, Gaynor J, Lafrancois J, Simpkins J, Refolo LM, Petanceska S, Wang R, Duff K (2002) Modulation of A(beta) peptides by estrogen in mouse models. *J Neurochem.* 80: 191–196.
- Zhu G, Huang Y, Chen Y, Zhuang Y, Behnisch T (2012) MPTP modulates hippocampal synaptic transmission and activity-dependent synaptic plasticity via dopamine receptors. *J Neurochem.* 122: 582–593.
- Zucker RS (1989) Short-term synaptic plasticity. *Annu Rev Neurosci.* 12: 13–31.